

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**“DETERMINACIÓN DE NITRITO EN SUERO SANGUÍNEO Y  
LÍQUIDO SINOVIAL DE ARTICULACIÓN CARPAL EQUINA  
CON INFLAMACIÓN AGUDA Y CON PATOLOGÍA CARPAL  
CRÓNICA REAGUDIZADA.”**

**MAURICIO ANDRÉS QUEZADA CATALÁN**

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas

Animales

**Profesor Guía: Héctor Adarmes Ahumada**

**Santiago – Chile**

**2006**

# ÍNDICE

1.	<b>RESUMEN</b> .....	3
2.	<b>SUMMARY</b> .....	5
3.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
4.	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
	•Articulación Sinovial o Diartrosis.....	9
	•Recambio Molecular de los Componentes de la Matriz Extracelular.....	13
	•Recambio Molecular Patológico.....	15
	•El Óxido Nítrico y su Rol en la Artritis.....	22
5.	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	29
6.	<b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	30
7.	<b>RESULTADOS</b> .....	36
8.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	46
9.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	53
10.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	54

# **RESUMEN**

El óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), producido en grandes cantidades por los condrocitos y células inflamatorias en una articulación dañada puede generar activación de enzimas degradativas de la matriz del cartílago, disminución en la síntesis de sus biomoléculas y apoptosis de condrocitos. Parte del  $\text{NO}$  producido se transforma en nitrito, el cual se puede medir por la reacción de Griess. El objetivo de este estudio fue comparar el promedio de nitrito en líquido sinovial y suero sanguíneo entre grupos de equinos Fina Sangre de Carrera con cuadros articulares inflamatorios agudos y crónicos con reagudización, para establecer si la menor cantidad de cartílago articular en el caso de los cuadros crónicos se traduce en una menor concentración de nitrito tanto en LS como en suero sanguíneo.

Se tomaron muestras de líquido sinovial y suero sanguíneo de equinos que cursaran con un cuadro inflamatorio agudo de la articulación carpal ( $n=10$ ), principalmente fractura en chip o sinovitis diagnosticadas clínica y/o radiológicamente al momento de la toma de muestra, se incluyen equinos con diagnóstico de cuadro crónico al momento de la toma de muestra ( $n=15$ ), desde la misma articulación. Además se obtuvo muestras de suero sanguíneo desde equinos normales para usarlos como control ( $n=10$ ). En todas las muestras se determinó la concentración de nitrito por reacción de Griess y además se midió la concentración de proteínas como indicador del estado del animal por el método colorimétrico de Lowry et al.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas en LS entre los grupos agudos ( $26,1 \pm 6,2$  mg/mL) y crónicos con reagudización ( $25,2 \pm 8,1$  mg/mL). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitrito tanto en el LS

entre los grupos agudo ( $95,1 \pm 41,4 \mu\text{mol/L}$ ) y crónico con reagudización ( $75,8 \pm 21,2 \mu\text{mol/L}$ ) como en el suero con valores de  $471,4 \pm 115,4 \mu\text{mol/L}$  para los cuadros agudos en comparación con los cuadros crónicos con reagudización ( $427,9 \pm 101,9 \mu\text{mol/L}$ ) y con los cuadros normales ( $455,9 \pm 91,1 \mu\text{mol/L}$ ). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores de proteínas séricas entre los grupos agudo y normal, pero a favor del grupo normal, obteniendo el grupo agudo un promedio de  $56,5 \pm 11,2 \text{ mg/mL}$ , los normales  $67,0 \pm 3,1 \text{ mg/mL}$ , y finalmente el grupo de los crónicos reagudizados con  $60,7 \pm 7,5 \text{ mg/mL}$ .

La concentración de nitrito en el líquido sinovial en los grupos agudo y crónico reagudizado no muestra diferencia significativa, lo que podría deberse a que ambos grupos están cursando un cuadro inflamatorio, que genera infiltración con células que también producen  $\text{NO}$ .

La ausencia de diferencia en la concentración de nitrito en el suero sanguíneo entre los grupos agudo, crónico reagudizado y normal, sugiere que la concentración de nitrito en el suero sanguíneo no es un buen reflejo de la producción de  $\text{NO}$  a nivel articular.

# SUMMARY

Nitric oxide ( $\text{NO}$ ), which is produced in large amounts in a damaged joint by chondrocyte and inflammatory cells, may induce activation of degradative enzymes of the cartilage's matrix, decrease the biomolecules synthesis, and chondrocyte apoptosis. Part of the produced  $\text{NO}$  is transformed in nitrite, which can be measured by the Griess reaction. The goal of this study was to compare the nitrite average in synovial fluid and blood serum between equine groups with acute and chronic with reactivity inflammatory joint profiles, to establish if the lower amount of cartilage in chronic cases translates into a lower nitrite concentration in synovial fluid and serum.

Samples of synovial fluid and serum were obtained from equines with acute inflammatory profile of the carpal joint ( $n=10$ ), most of them with chip fracture or synovitis diagnosed by X-ray and/or clinically diagnosed at the moment of obtaining the sample, and from equines which had diagnoses of chronic profile at the moment of obtaining the sample ( $n=15$ ), from the same joint. Furthermore samples of serum was obtained from normal equines to use them as control ( $n=10$ ). In all the samples the nitrite concentration was measured by Griess reaction and also the protein concentration was measured as an indicator of the animal state by the colorimetric Lowry et al's method.

There were no significant differences in the synovial fluid protein average concentration between the acute ( $26,1 \pm 6,2 \text{ mg/mL}$ ) and chronic groups ( $25,2 \pm 8,1 \text{ mg/mL}$ ). There were no significant differences in the synovial fluid nitrite between the acute cases ( $95,1 \pm 41,4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ) compared with the chronic cases ( $75,8 \pm 21,2 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ). In serum nitrite concentration,

significant differences was not found, between the acute cases ( $471,4 \pm 115,4 \mu\text{mol/L}$ ) in comparison with chronic cases ( $427,9 \pm 101,9 \mu\text{mol/L}$ ) and normal cases ( $455,9 \pm 91,1 \mu\text{mol/L}$ ). There were significant differences in the serum protein values in the acute and normal groups, but in benefit to the normal group, obtaining the acute group an average of  $56,5 \pm 11,2 \text{ mg/mL}$ , the normal group  $67,0 \pm 3,1 \text{ mg/mL}$ , and the chronic group  $60,7 \pm 7,5 \text{ mg/mL}$ .

The nitrite average in synovial fluid in both groups, acute and chronic with reactivity do not show significant differences, that could be due to the inflammatory profile in both groups generating infiltration with  $\text{NO}$  producing cells.

Serum nitrite concentration do not show differences between the acute, chronic and normal groups, suggesting that serum nitrite concentration is not a good reflect of the  $\text{NO}$  production within the joint.

# **INTRODUCCIÓN**

El equino ha jugado un papel destacado en la historia del hombre, desarrollando actividades relevantes en la agricultura, en la guerra, en el deporte y la recreación.

La actividad normal del equino requiere de un buen estado de salud, especialmente de su sistema músculo esquelético debido al tipo de trabajo que desarrolla. Para la actividad física tienen una importancia primordial las articulaciones, cuyo estado definirá la continuidad de la actividad que desempeña o al contrario su marginación.

Desde hace tiempo ha cobrado importancia el conocer los mecanismos involucrados en la patología articular del equino, para establecer mejores alternativas terapéuticas, o mejor aún, métodos de diagnóstico precoces que permitan mantener una salud articular compatible con la función del animal. Entre las artropatías relevantes se encuentra la Enfermedad Degenerativa Articular (EDA) debido a su prevalencia en la clínica del equino y a que constituye el cuadro final al que derivan muchas artropatías agudas.

Dentro de los mecanismos involucrados en la patogenia de la EDA, se ha establecido que mediadores proinflamatorios como la interleuquina 1 y el Factor de Necrosis Tumoral alfa pueden inducir la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa tipo II (iNOS) en condrocitos, la cual cataliza la síntesis de óxido nítrico (NO) que, producido en grandes cantidades puede producir activación de enzimas degradativas de la matriz del cartílago articular, disminución de

la síntesis de biomoléculas y apoptosis de condrocitos. Parte del  $\cdot\text{NO}$  puede transformarse en nitrito, el cual puede determinarse a través de una reacción colorimétrica.

En este trabajo se busca determinar si la concentración de nitrito –considerado como marcador de la síntesis de  $\cdot\text{NO}$  en el líquido sinovial -de la articulación carpal de equinos Fina Sangre de Carrera, experimenta variaciones entre procesos articulares agudos y crónicos reagudizados, considerando el proceso degenerativo del cartílago en el último caso, y establecer si estas concentraciones tienen relación con la concentración sanguínea de nitrito.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## ARTICULACIÓN SINOVIAL O DIARTROSIS

Las articulaciones móviles o **diartrosis** están formadas por la unión de dos o más huesos y se caracterizan por la presencia de una cavidad articular delimitada externamente por la cápsula articular (Todhunter, 1996; Garnero *et al.*, 2000).

Las superficies articulares óseas poseen formas muy variadas con superficies lisas recubiertas por cartílago de naturaleza hialina, que carece de vascularización y varía de grosor en las diferentes articulaciones, siendo más grueso en aquellas articulaciones que están sometidas a mayores exigencias compresivas. La función del cartílago articular es facilitar el deslizamiento de las superficies articulares opuestas disminuyendo el roce y amortiguando las compresiones mecánicas (Getty, 2000; Bird *et al.*, 2000).

La **cápsula articular** que rodea la articulación está formada por una capa externa fibrosa, o ligamento capsular, y por una capa interna o membrana sinovial que recubre la cavidad articular excepto los cartílagos, delimitando la cavidad articular, que normalmente contiene un pequeño volumen de líquido sinovial (LS), que lubrica el cartílago articular (Todhunter, 1996; Getty, 2000).

El **ligamento capsular** es un tejido conectivo con bajo contenido de células y cuya matriz extracelular (MEC) está formada principalmente por colágeno, especialmente de tipo I, proteoglicanos, proteína no colagenosa y agua (Todhunter, 1996).

La **membrana sinovial**, está formada por un estrato superficial de células (la íntima) llamados sinoviocitos, una red microvascular superficial y por un sustrato de tejido conectivo

(la subíntima). La íntima es una capa incompleta cuyo espesor es de uno a cuatro sinoviocitos que carecen de membrana basal. Los sinoviocitos son células que tienen función fagocítica y secretoria. Los sinoviocitos con función fagocítica y pinocítica son los llamados "*sinoviocitos tipo A*". A su vez los "*sinoviocitos tipo B*" son células similares a fibroblastos, los cuales producen matriz extracelular y sintetizan ácido hialurónico, que forma parte del LS. Estos sinoviocitos tipo B también sintetizarían la lubricina, una glicoproteína involucrada en la lubricación periférica del cartílago (Todhunter, 1996; Garnero *et al.*, 2000).

El **líquido sinovial** participa en la lubricación, nutrición y eliminación de desechos del cartílago. Es un ultrafiltrado del plasma y la mayoría de sus iones y moléculas también se encuentran en el plasma a excepción del ácido hialurónico, que se encuentra en alta concentración en el líquido sinovial (aproximadamente 0,5 mg/mL) y le proporciona sus características de viscosidad, siendo su síntesis catalizada por la enzima hialuronato sintasa. El LS normal también contiene células mononucleares como sinoviocitos, monocitos y linfocitos, que constituyen el 90% del total de las células presentes. El resto de las células son linfocitos polimorfonucleares. Se describe que el líquido sinovial normal del equino contiene hasta 500 células nucleadas/mL (Todhunter, 1996).

El **cartílago articular** posee una apariencia traslúcida y vidriosa debido principalmente a su gran contenido de agua (70 a 80%) y a la fina estructura del entramado de colágeno. El extracto seco del cartílago articular contiene alrededor de un 50% de colágeno, 35% de proteoglicanos, 10% de glicoproteínas, 3% de minerales y un 1% de lípidos. Además contiene entre 1 y 12% de condrocitos (Todhunter, 1996). Tiene propiedades que dependen de la estructura y organización de sus macromoléculas en la MEC, cuya importancia puede ser apreciada estudiando las funciones de los dos mayores componentes, el colágeno y los proteoglicanos. El colágeno, principalmente el tipo II forman una densa red fibrilar que está

incluida en una solución de proteoglicanos altamente concentrados, cuyas cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) con gran cantidad de cargas aniónicas atraen agua dentro del tejido, creando una gran presión osmótica, la que expande la red de colágeno. La hidratación del cartílago depende del balance entre la tensión del colágeno y la presión osmótica, lo que provee las propiedades biomecánicas características al cartílago articular, es decir, su resistencia a la deformación y a la compresividad (Platt, 1996; Bird *et al.*, 2000; Goldring, 2000; Poole *et al.*, 2002).

El **colágeno** es una proteína compuesta por tres cadenas polipeptídicas, formadas cada una de ellas por aproximadamente 1000 aminoácidos. Estas cadenas, llamadas "*cadena alfa* ( $\alpha$ )", se asocian en una triple hélice formando un espiral. La firmeza de la hélice se incrementa por enlaces entre cadenas  $\alpha$  de una misma hélice, y entre moléculas de colágeno de hélices adyacentes. Estos enlaces entre moléculas son muy importantes para dar y mantener la firmeza de los tejidos colagenosos (Gunson, 1979). Las moléculas de colágeno fibrilar tipo I, II, III, V y XI se organizan en forma similar, formando una triple hélice. La mayor parte del colágeno del cartílago articular es tipo II que representa un 85 a un 90 % del total. También se encuentra una pequeña cantidad de los tipos VI, IX, XI, XII y XIV (Todhunter, 1996).

El **colágeno tipo II** es un homotrímero ( $3\alpha 1(\text{II})$ ) que proporciona la fuerza de tensión del cartílago articular. Hay evidencia de que los colágenos tipo IX y posiblemente también el tipo XI, contribuyen en gran manera en la organización y estabilidad biomecánica de la red fibrilar de colágeno tipo II, encontrándose colágeno tipo IX en la superficie de las fibras de colágeno tipo II y colágeno tipo XI en la superficie y el centro de las fibras tipo II (Platt, 1996, Todhunter, 1996, Garnero *et al.*, 2000; Poole *et al.*, 2002).

Los **proteoglicanos (PG)** son componentes abundantes en la matriz del cartílago articular, formados por una proteína central a la que se unen carbohidratos sulfatados, los GAGs. La proteína central de los PG tiene una masa molecular entre 11 y 220 KDa, y el número de GAGs unidos a ella varía entre uno a cerca de 100 (Ruoslahti, 1988).

Un **glicosaminoglicano** está formado por una cadena lineal de unidades repetidas de disacáridos de hexosamina (glucosamina o galactosamina) alternados con otros residuos de carbohidratos (ácido glucurónico, ácido idurónico, o galactosa).

Los principales GAGs encontrados en el cartílago son condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, queratán sulfato, y ácido hialurónico (el cual es el único que no es sintetizado unido al centro proteico) (Platt, 1996). Los GAGs poseen una gran capacidad hidrodinámica, lo que significa que ellos se unen a una gran cantidad de agua en relación a su peso. Además los GAGs interactúan con muchas otras moléculas a través de interacciones electrostáticas, describiéndose que la mayoría de las proteínas de la matriz, incluyendo los colágenos, y muchos factores de crecimiento tienen sitios de unión para GAGs (Ruoslahti, 1988).

El **agrecán** se encuentra entre los proteoglicanos más estudiados del cartílago articular, ya que es posible aislarlo en gran cantidad con relativa facilidad. Forma grandes agregados macromoleculares por la unión de muchos monómeros de proteoglicanos a una molécula de ácido hialurónico. Hasta 100 monómeros de PG pueden unirse a una sola cadena de ácido hialurónico, y por lo tanto, la masa molecular del complejo entero podría llegar a  $2 \times 10^5$  KDa. Este complejo es estabilizado por glicoproteínas de 40 a 50 KDa, conocidas como proteínas de unión, las que impiden que el complejo se disocie en condiciones normales (Platt, 1996; Todhunter, 1996; Goldring, 2000).

En el cartílago también se encuentran pequeños PG no agregados, los que a pesar de su pequeña masa molecular tienen una relativa abundancia en la cantidad total de PG encontrados en el cartílago (Todhunter, 1996). Aquí se encuentran los PG ricos en leucina, los cuales ayudan a mantener la estructura del cartílago interactuando con la red de colágeno (Goldring, 2000).

### **RECAMBIO MOLECULAR NORMAL DE LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.**

Los colágenos fibrilares presentan una rigidez y una resistencia a los ataques proteolíticos característica, y están sometidos a un lento recambio, pero suficiente para reparar y remodelar al cartílago. Los PG en cambio son uno de los componentes más dinámicos en la MEC del cartílago y su recambio normal permite una renovación constante de los componentes del tejido, sin una alteración de las características funcionales de la MEC (Platt, 1996).

Se han identificado muchas proteinasas capaces de degradar los componentes de la MEC del cartílago, que incluyen a las metaloproteinasa de la matriz (MMPs), un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc, secretadas como proenzimas y que están involucradas en el recambio fisiológico de la MEC del cartílago, pero que en procesos patológicos pueden producir una excesiva destrucción de él (Clegg *et al.*, 1997a).

La colagenasa tisular o intersticial, también llamada **MMP-1** tiene como sustrato específico al colágeno y separa las tres cadenas de la triple hélice en puntos específicos, entre los residuos 775 y 776 (glicina e isoleucina, respectivamente) en las cadenas  $\alpha 1$  de los

colágenos I, II, y III, y actúa también sobre los colágenos tipos VII, VIII, y X. Esta colagenasa es producida por un gran número de células tales como macrófagos, fibroblastos, sinoviocitos, osteoblastos, condrocitos y células endoteliales (Mc Ilwraith, 1996). En términos patológicos esta enzima sería importante sólo en un pequeño número de casos de EDA en humanos, y se piensa que estaría más relacionada a la degradación de colágeno que ha sido sintetizado recientemente (Poole *et al.*, 2002).

La estromelisina, **MMP-3**, es la colagenasa más importante que se ha encontrado en cultivos de fibroblastos, sinoviocitos y otros cultivos celulares. La estromelisina tiene una gran variedad de sustratos incluyendo PGs, y los colágenos tipo IV, V, VII, IX, y XI. La MMP-3 tiene también un papel importante en la activación de procolagenasas a colagenasas (Mc Ilwraith, 1996; Goldring, 2000).

Las metaloproteinasas llamadas genéricamente gelatinasas (**MMP-2** y **MMP-9**) tienen actividad sobre los colágenos menores del cartílago, así como también sobre el agregán, su proteína central y la proteína de unión del cartílago. Estas dos gelatinasas pueden tener un papel importante en la patogénesis de la enfermedad articular ya que potencian la actividad de las colagenasas (MMP-1 y MMP-3) (Clegg *et al.*, 1997a). La **MMP-2** es capaz de degradar colágenos tipo II y IV desnaturados y también tiene actividad sobre fibronectina, elastina, y colágenos tipo V, VII, X y XI, pero no contra los tipos I y VI. La **MMP-9** tiene actividad sobre los colágenos tipo IV y V (Mc Ilwraith, 1996).

La **MMP-7** actúa en forma similar a la estromelisina, degradando PG, fibronectina y gelatina, pudiendo además activar colagenasas (Mc Ilwraith, 1996).

A las **MMP-13** y **MMP-14** se les llama MMP de membrana tipo I. La **MMP-13** quizás juega el papel más importante en la patogénesis de la EDA, degradando las fibras de colágeno desde la célula (Poole *et al.*, 2002).

Todas estas MMPs pueden ser producidas tanto por células propias de la articulación como por ejemplo los condrocitos, sinoviocitos A y B, así como también por células inflamatorias como los neutrófilos, los cuales producen grandes cantidades de MMP-9, y los macrófagos (Clegg *et al.*, 1997a).

Las MMPs son inhibidas por los **inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs)**, de los cuales se han identificado cuatro tipos, actuando a través de la formación de un complejo enzima-inhibidor en proporción equimolecular. Los TIMPs se encuentran en muchos tejidos conectivos y son quizás los inhibidores más potentes encontrados en el cartílago articular. Posiblemente en condiciones fisiológicas su síntesis está cuidadosamente controlada por los mismos mecanismos que regulan la producción de las MMPs (Mc Ilwraith, 1996; Nagasse y Woessner, 1999).

Los condrocitos a pesar de su aislamiento mantienen la homeostasis del cartílago regulando la activación o inactivación de las MMPs, y las alteraciones de su metabolismo podrían determinar el deterioro gradual de la MEC del cartílago articular, como ocurre en procesos patológicos como la osteoartritis (Platt, 1996).

### **RECAMBIO MOLECULAR PATOLÓGICO.**

La **Osteoartritis (OA)** o EDA representa a un grupo de desórdenes caracterizados por un deterioro del cartílago articular, acompañado por cambios en el hueso subcondral y en los tejidos blandos de la articulación (Mc Ilwraith, 1996; Notoya *et al.*, 2000; Bird *et al.*, 2000; Goldring, 2000; Sandell y Aigner, 2001). Esta enfermedad ha sido definida de varias formas lo que ha llevado a confusión, pero existe acuerdo en que involucra la pérdida de la función del cartílago originada por su erosión y por la reducción del contenido de PG junto a cambios en

la estructura de estas moléculas, en su grado de agregación y un incremento en el contenido de agua del cartílago. Más recientemente se ha demostrado también que hay una alteración en la estructura del colágeno (Mc Ilwraith, 1996). En un cartílago maduro normal, los condrocitos sintetizan una cantidad suficiente de macromoléculas para mantener la integridad de la matriz. Sin embargo, en respuesta a los cambios que ocurren en la EDA, no pueden sintetizar la cantidad suficiente de matriz para reparar adecuadamente los defectos del tejido (Notoya *et al.*, 2000; Sandell y Aigner, 2001).

Después de la ruptura inicial de colágeno tipo II por las colagenasas, éste es desnaturado y retirado. Posteriormente los condrocitos se vuelven hipertróficos, produciendo y secretando colágeno tipo X. Esta diferenciación es normal en las placas de crecimiento como parte de la osificación endocondral. La ruptura del colágeno tipo II por la MMP-13 es seguida por una diferenciación de los condrocitos y una mineralización de la matriz, la cual también ocurre en la EDA en asociación con estos cambios. De esta manera la diferenciación de los condrocitos en la EDA parece ser una respuesta a un daño extenso en la red fibrilar de colágeno, y la actividad de las colagenasas parece jugar un papel importante aquí, aunque no se sabe si esta hipertrofia de células también implica una mayor expresión de MMP-13 y de las otras MMPs, incluyendo las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). Además las células hipertróficas eventualmente terminan en apoptosis, lo cual es común en cartílagos osteoartríticos. En este sentido se ha demostrado que el nivel de apoptosis es mayor en condrocitos de pacientes con EDA en relación a aquella que existe en pacientes humanos normales. En humanos y conejos con EDA en estados iniciales se han evidenciado condrocitos apoptóticos y se ha descrito una relación entre el grado de severidad de la EDA y el grado de apoptosis de los condrocitos (Héraud *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios realizados en



ratones y ratas han evidenciado que la pérdida de células en el cartílago articular adulto aumenta en relación a la edad del individuo (Héraud *et al.*, 2000; Poole *et al.*, 2002).

De esta manera el cartílago osteoartrítico está bajo un proceso de cambios crónicos degenerativos, dados por cambios fenotípicos, asociados a diferenciación de condrocitos. El daño al colágeno, su pérdida junto con el agregán, y la calcificación de la matriz generan un cartílago muy debilitado en comparación con uno normal, y es en estas condiciones que, en particular la carga mecánica traumatiza más directamente al cartílago y lo daña más, lo cual conduce finalmente a una pérdida neta de cartílago articular (Poole *et al.*, 2002).

La EDA en humanos ha sido considerada clásicamente como una enfermedad primaria del cartílago articular, con sinovitis e inflamación de tejidos blandos como cambios secundarios. Sin embargo, estos tejidos blandos han ido adquiriendo mayor importancia para algunos autores, principalmente la membrana sinovial, debido a que su inflamación se correlaciona con la actividad de las MMPs . De hecho, la **sinovitis** y la **capsulitis** son cambios iniciales comunes en articulaciones de caballos atléticos y se presume que están asociadas al trauma repetido. Se piensa también que la sinovitis aparece en conjunto con un daño a la cápsula fibrosa. La membrana sinovial es débil y no tiene una función biomecánica conocida, pero se sabe que un daño a ella puede tener consecuencias para la fisiología o la fisiopatología de la articulación. Se ha sugerido que algunos de estos traumas afectan la difusión a través de la membrana sinovial con un efecto primario sobre el metabolismo de los sinoviocitos. El daño mecánico de los sinoviocitos puede estimular la liberación de enzimas degradativas y citoquinas, lo que alteraría el ambiente intraarticular afectando al cartílago articular. Se ha sugerido también que las altas presiones intraarticulares podrían disminuir el flujo sanguíneo a través de los capilares sinoviales, lo que no sólo disminuiría la tensión de oxígeno en la articulación sino que puede potencialmente llevar a daño por reperfusión (McIlwraith, 1996).

Además de los daños directos sobre la membrana sinovial, también se describe la reacción de ésta a los productos del cartílago articular dañado. La presencia de partículas cartilaginosas dañadas o bien la liberación de PG al LS, provoca sinovitis, incrementa la producción celular de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), citoquinas y de MMPs (colagenasa, estromelina y gelatinasa) (McIlwraith, 1996).

Se ha demostrado que los sinoviocitos son una rica fuente de enzimas proteolíticas con actividad sobre colágeno y PG (McIlwraith, 1996; Clegg *et al.*, 1997a; Clegg *et al.*, 1997b). Los condrocitos y sinoviocitos aislados desde articulaciones normales no muestran producción detectable de estas enzimas, pero al ser estimuladas por interleuquina-1 producen altos niveles de estromelina. En otro estudio se evidenció que condrocitos en cultivo y estimulados con interleuquina 1 produjeron cantidades significativas de enzimas proteolíticas (McIlwraith, 1996). Por otro lado Rechenberg *et al.*, (2000) evidenciaron que cultivos de membrana sinovial y condrocitos de equinos sin enfermedad articular liberan mediadores locales tales como NO y PGE<sub>2</sub>, así como también enzimas con actividad proteolítica. Así mismo se ha establecido que la actividad de las MMPs está claramente aumentada en estados avanzados de EDA así como en el desarrollo inicial de lesiones focales de EDA (Poole *et al.*, 2002).

En la patogénesis de enfermedades articulares humanas y posiblemente también del equino se han descrito a las especies reactivas del oxígeno (ROS), que tienen la capacidad de oxidar y por lo tanto de dañar a muchos componentes de la articulación. El trauma puede producir incremento de las ROS debido al daño celular con activación de fagocitos. Numerosos estudios en humanos y animales han revelado que el daño oxidativo en las articulaciones aumenta durante procesos patológicos. El daño causado por estas sustancias no sólo se relaciona con la degradación de los componentes de la MEC, sino también con la

disminución de la viscosidad del LS, la interrupción del metabolismo energético del condrocito y la alteración de su proceso mitótico (Dimock *et al.*, 2000).

En resumen, el daño sobre la membrana sinovial es importante debido a que potencia la liberación de enzimas lisosomales, particularmente MMPs, libera PGE, ROS y lo más importante, de citoquinas, particularmente interleuquina-1, la cual causa indirectamente la liberación de MMPs desde los condrocitos y sinoviocitos (Mc Ilwraith, 1996; Goldring, 2000; Sandell y Aigner, 2001).

Muchas de las moléculas anteriormente nombradas son liberadas por acción de **citoquinas**, que son péptidos solubles liberados por una célula y que afectan la actividad de otro tipo de células. Entre las citoquinas que participan en los procesos articulares se encuentran:

**Interleuquina 1 (IL-1):** Es un péptido de una masa 17 KDa con dos formas relacionadas, pero distintas: la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , que se liberan en respuesta a infección, toxinas bacterianas, agentes inflamatorios, productos de linfocitos activados y complejos inmunes (Mc Ilwraith, 1996; Platt, 1996).

Se ha descrito que disminuye la síntesis de colágeno tipo II y de PGs en el cartílago articular. Otros estudios han demostrado que es capaz de aumentar el metabolismo degradativo en el cartílago, aumentando la producción de MMPs, de PGE<sub>2</sub>, de factor plasminógeno celular, de radicales superóxidos, y de interleuquina-6, que se asocian al aumento de la degradación de la matriz del cartílago en una variedad de especies, incluyendo al equino (Mc Ilwraith, 1996; Bird *et al.*, 2000). En condrocitos osteoarthríticos, se ha detectado un aumento de la expresión de receptores para IL-1 asociada al aumento de la producción de MMPs (Goldring, 2000).

La IL-1 también tiene efectos sobre la membrana sinovial, induciendo la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno y la producción de GAGs (Mc Ilwraith, 1996). En condrocitos humanos de pacientes normales y con EDA se ha observado un nivel de apoptosis dependiente de los niveles de IL-1 $\beta$ , el cual es mayor en los condrocitos de pacientes con EDA, los cuales además poseen una mayor cantidad de receptores para esta citoquina, en relación a condrocitos normales (Héraud *et al.*, 2000).

**Interleuquina 6 (IL-6):** Posee una masa de 26 KDa y diversas actividades incluyendo la estimulación de la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos y actividad mitogénica para los linfocitos T. Se ha demostrado que los condrocitos humanos pueden sintetizar IL-6, y que pueden ser estimulados de forma dosis dependiente por la IL-1, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), y lipopolisacáridos bacterianos (Platt, 1996; Goldring, 2000). También se ha demostrado que los sinoviocitos y los fibroblastos de la cápsula articular pueden sintetizar IL-6. En el proceso de la EDA, la IL-6 podría amplificar el proceso inflamatorio por su acción sobre los linfocitos B y T provocando mayor producción de citoquinas que estimulan la síntesis y activación de enzimas proteolíticas, las que a su vez pueden inhibir la síntesis y aumentar la degradación de los PGs de la MEC (Platt, 1996).

**Interleuquina 8 (IL-8):** Tiene una masa molecular de 6,5 KDa y es un potente agente quimiotáctico para neutrófilos. En respuesta a ella los condrocitos y los fibroblastos liberan radicales superóxido y enzimas lisosomales. Su rol en el metabolismo de la MEC del cartílago es desconocido, pero se ha demostrado que la IL-1 induce la síntesis de IL-8 en condrocitos *in vitro*, y esta potenciación podría estimular la migración de células inflamatorias hacia los tejidos articulares durante el proceso inflamatorio (Platt, 1996; Goldring, 2000).

**Factor de Necrosis Tumoral (TNF):** Existe en dos formas con un alto grado de homología de sus secuencias aminoacídicas: el **factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )** es un péptido de 17 KDa producido principalmente por la actividad de los monocito-macrófagos; el **TNF- $\beta$**  o **linfotoxina**, es un péptido de 18 KDa producido por la actividad de los linfocitos T. En lo que se refiere a la destrucción del cartílago articular inducen el aumento en la producción de IL-1 e IL-6 en varias líneas celulares y la inhibición de la síntesis de PG con un pequeño efecto en el catabolismo del cartílago articular humano y equino (Platt, 1996). Estudios de citoquinas en tejidos articulares sugieren que la IL-1 y el TNF modulan la síntesis de MMPs en condrocitos y sinoviocitos (Mc Ilwraith, 1996). En animales se ha demostrado que la inyección intraarticular de preparaciones recombinantes de IL-1, estimulan la degradación del cartílago articular, mientras que la inyección de preparaciones recombinantes o purificadas de IL-1 y TNF $\alpha$  produjeron una degradación mucho mayor que la inyección de cada una de las citoquinas por separado (Goldring, 2000). En pacientes humanos con EDA, en sitios de pérdida local de cartílago se ha localizado la expresión de un receptor para TNF (Goldring, 2000).

La IL-1 y el TNF- $\alpha$  tendrían un papel clave en la degeneración del cartílago con EDA, debido a que no sólo aumentan estas citoquinas en el cartílago sino que también aumentan sus receptores. Estas dos citoquinas son activamente producidas por los condrocitos de la mayoría de los pacientes humanos y están directamente involucradas en la ruptura del colágeno y los PG, lo que se demostraría por la inhibición de la actividad degradativa en cultivos de condrocitos con EDA al bloquear los receptores para IL-1 y TNF $\alpha$ . (Poole *et al.*, 2002). Así se observó la detención de la degradación excesiva de colágeno por colagenasas en dos tercios de

los pacientes estudiados y la detención de la degradación y el aumento del contenido de agregán en cerca de un 50% de estos pacientes (Poole *et al.*, 2002).

Algunos trabajos en articulaciones con EDA han demostrado que la membrana sinovial y el cartílago articular de articulaciones con EDA moderada, tienen concentraciones más elevadas de mediadores locales y de enzimas con actividad degradativa de colágeno, y además que articulaciones con EDA severa presentan niveles de estas moléculas de acuerdo al grado de severidad de la lesión (Rechenberg *et al.*, 2000). Además los niveles de MMP-2 y MMP-9 están aumentados en el LS de articulaciones de caballos con EDA en comparación con el LS de articulaciones sanas (Clegg *et al.*, 1997b).

De esta forma, un problema importante tanto en medicina humana como en medicina veterinaria es el diagnóstico temprano de la EDA, debido a que la degradación de la matriz del cartílago comienza mucho antes que ocurran en él los cambios macroscópicos, y los cambios visibles en el cartílago pueden estar presentes por mucho tiempo antes que aparezcan los signos clínicos o radiográficos (Spreng *et al.*, 2001).

### **EL ÓXIDO NÍTRICO Y SU ROL EN LA ARTRITIS.**

El  $\cdot\text{NO}$  es un radical libre el cual se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina, debido a la acción de una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual se han descrito tres isoenzimas, NOS-I, NOS-II y NOS-III, las cuales combinan oxígeno molecular con el carbono guanidino terminal de la L-arginina, obteniendo  $\cdot\text{NO}$  y L-citrulina como productos. Es una molécula mensajera que coordina diversos procesos fisiológicos desde la relajación del músculo liso, la inhibición de la activación plaquetaria y la neurotransmisión, hasta la respuesta

antipatogénica y tumoral (Murrell *et al.*, 1995; Moshage, 1997; Ralston, 1997; Clancy *et al.*, 1998; Stichtenoth y Frölich, 1998; Miranda *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Ersoy *et al.*, 2002).

Las tres isoformas de NOS son codificadas por genes distintos. La NOS-I, también conocida como NOS neuronal (nNOS) se encuentra en alta proporción en el tejido nervioso. La NOS-II o NOS inducible (iNOS), puede ser producida por casi todas las células del organismo, siendo particularmente importante en monocito/macrófagos, neutrófilos y hepatocitos. La NOS-III o NOS endotelial (eNOS), se identificó inicialmente como el factor relajante endotelial. La NOS-I y la NOS-III fueron llamadas inicialmente NOS constitutivas (cNOS), aunque hoy se sabe que su expresión también está regulada por una serie de factores tanto fisiológicos como patológicos (Föstermann *et al.*, 1998). La NOS-II en cambio solamente se expresa en células que han sido estimuladas, y factores tales como endotoxinas, citoquinas proinflamatorias como IL-1, interferón gamma (IFN $\gamma$ ), y TNF $\alpha$ , inducen su expresión. Otras citoquinas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ , y las IL- 4, -8, 10 y -13 pueden inhibir la síntesis de esta enzima, y lo mismo ocurre con los glucocorticoides. En cuanto al nivel de producción de  $\text{NO}$ , la NOS-II produce niveles mucho más altos de  $\text{NO}$  en comparación con la NOS-I y la NOS-III, y se piensa que estos altos niveles de  $\text{NO}$  son responsables de la actividad bactericida característica de las células que expresan esta isoforma de la enzima (Murrell *et al.*, 1995; Moshage, 1997; Ralston, 1997; Stichtenoth y Frölich, 1998; Davis *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2001).

Otra diferencia entre las NOS radica en que las formas I y III son  $\text{Ca}^{++}$  dependientes, aunque se ha descrito en hepatocitos humanos una NOS-II dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ , y también en condrocitos humanos y de conejos una NOS-II que además no es inhibida por corticoides (Stichtenoth y Frölich, 1998).

Además de sus funciones fisiológicas, el  $\text{NO}$  ha sido relacionado con la patogenia de muchas enfermedades como cáncer, diabetes, y enfermedades neurodegenerativas así como también en enfermedades inflamatorias, tales como la miocarditis, nefritis y otras más, entre ellas la EDA en especies como el hombre, el perro y el equino (Moshage, 1997; Rechenberg *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2001; Spreng *et al.*, 2001).

A nivel articular, la producción fisiológica de  $\text{NO}$  inhibiría la resorción ósea por osteoclastos, y la degradación de la matriz por parte de la  $\text{IL-1}\beta$  (en cartílago articular de bovino). De acuerdo a esto, la supresión de los efectos antiinflamatorios y protectivos del  $\text{NO}$  podría provocar inflamación y daño de tejidos (Stichtenoth y Frölich, 1998).

Por otra parte el aumento en la síntesis de  $\text{NO}$  producido por la membrana sinovial incrementa la resorción de hueso, disminuye su proliferación, disminuye la síntesis de PG, activa MMPs e induce apoptosis de condrocitos (Stichtenoth y Frölich, 1998). De esta manera, la producción de  $\text{NO}$  sería importante tanto para la homeostasis de un cartílago normal así como también para la patogenia de la EDA.

En humanos se han identificado las siguientes fuentes de  $\text{NO}$  tanto intraarticular como extraarticular, asociado a las inflamaciones articulares: fibroblastos sinoviales, sinoviocitos, células endoteliales, monocito/macrófagos sanguíneos y de la membrana sinovial, osteoblastos y condrocitos, particularmente los condrocitos superficiales (Stichtenoth y Frölich, 1998). Sin embargo, Grabowski *et al.*, (1997) encontraron que la NOS-II está altamente expresada en pacientes humanos con enfermedades articulares inflamatorias en tejidos tales como la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, condrocitos, y la capa interna de la membrana sinovial, donde además, las principales células responsables de la expresión de NOS-II serían los macrófagos y los fibroblastos, pero que en pacientes sanos estos mismos tejidos no la expresan.



Murell *et al.*, (1995) evidenciaron que, una vez inducida, la actividad de la NOS-II se correlaciona positivamente con la actividad de las metaloproteinasas tanto en cultivos de condrocitos bovinos como en trozos de cartílago humanos cultivados (explantes), y que el  $\text{NO}$  exógeno también induce la actividad de estas enzimas. Al contrario, al inhibir la actividad de la NOS-II, también disminuyó la actividad de las metaloproteinasas.

Goodstone y Hardingham (2002) evidenciaron en condrocitos porcinos tratados con citoquinas humanas que el  $\text{TNF-}\alpha$  es mucho más potente en la estimulación de la producción de  $\text{NO}$  en comparación con la  $\text{IL-1}\beta$ , y que ambas tenían similar capacidad para inhibir la síntesis de agregán. Por otro lado, Poole *et al.*, (2002) evidenciaron que la inhibición de la actividad de la  $\text{IL-1}$  puede detener la producción de  $\text{NO}$ .

En otro estudio, Lee *et al.*, (2002) detectaron niveles basales de  $\text{NO}$  en cultivos de condrocitos humanos que no estaban sometidos a estrés, pero que al ser sometidos a estrés por flujo aumentaron inmediatamente su producción de  $\text{NO}$ .

Se ha demostrado que los condrocitos pueden expresar enzimas tales como NOS-II, ciclooxigenasa-2, y fosfolipasa A2, cuando son estimuladas por  $\text{IL-1}$  sola o en combinación con  $\text{TNF-}\alpha$ , lo cual se traduce en liberación de  $\text{NO}$  y  $\text{PG E}_2$ . La producción endógena de  $\text{NO}$  quizás suprime la síntesis de MEC en el cartílago, y hay evidencia que induce apoptosis en condrocitos articulares (Goldring, 2000). Van't Hof *et al.*, (2000), describieron altos niveles de apoptosis en la capa interna de la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoídea (RA) en relación a aquellos que hay en pacientes con EDA o en condición normal, estableciendo además que existía una alta correlación entre la presencia de NOS-II y apoptosis en estas células. Posteriormente se trató a estos explantes de membrana sinovial con inhibidores de la NOS-II lo cual se tradujo en una disminución de las células apoptóticas, pero que al ser tratadas con el mismo inhibidor junto con un donador de  $\text{NO}$ , aumentó nuevamente

el nivel de apoptosis. Lo propio se observó en condrocitos sometidos a los mismos procedimientos, sugiriendo que el  $\text{NO}$  es un mediador de la apoptosis tanto de condrocitos como de sinoviocitos.

Se ha postulado que la respuesta inicial al aumento en la producción de  $\text{NO}$  en la membrana sinovial y en el cartílago articular, en casos de daño articular agudo, estaría relacionada con la protección del cartílago articular de la degradación que causan las MMPs. Esta respuesta se mantendría por un corto período de tiempo y si el estímulo se mantiene, el aumento de  $\text{PGE}_2$  y de la actividad de enzimas degradativas, ayudarían a gatillar la cascada de la degradación (Rechenberg *et al.*, 2000; Goldring, 2000).

Estudios realizados en cartílago articular de equinos indican que el  $\text{NO}$  tendría un efecto protector en forma posterior a la estimulación con citoquinas, protegiendo contra la degradación del agregán por proteinasas (Rechenberg *et al.*, 2000; Bird *et al.*, 2000). Sin embargo también tendría un efecto dañino, dado que inhibe la formación o reparación de tejido, incluyendo la síntesis de MEC y esto estaría relacionado con la actividad de la IL-1 la cual a su vez, regula la actividad de las MMPs de la matriz (Rechenberg *et al.*, 2000).

Los efectos negativos del  $\text{NO}$  se incrementan en situaciones de bajo nivel de oxígeno, como las que existen en el LS o el cartílago articular de pacientes con EDA o con RA. De esta manera los efectos de  $\text{NO}$  en este tipo de pacientes debieran ser más prolongados que los determinados en estudios *in vitro*, realizados en presencia de aire atmosférico. Así lo proponen también Tomita *et al.*, (2001) sosteniendo que el  $\text{NO}$  inhibiría el metabolismo energético de los condrocitos de conejos con EDA o RA, aumentando estos efectos a medida que el nivel de oxígeno disminuye en la articulación.

Así, el  $\text{NO}$  posee efectos antiinflamatorios y proinflamatorios, dependiendo de su origen, la cantidad en que sea producido y el tipo de célula sobre el que actúa, y estas

propiedades deben ser consideradas para interpretar los resultados de los estudios (Stichtenoth y Frölich, 1998).

Existen diversas técnicas para cuantificar  $\text{NO}$ , pero su corta vida media en medios biológicos (de 6 a 10 segundos) y sus bajas concentraciones en las muestras hacen que estos métodos sean poco practicables en muestras biológicas. Sin embargo, también se pueden medir los metabolitos estables del  $\text{NO}$ , **el nitrito y el nitrato** (Ralston, 1997; Stichtenoth y Frölich, 1998; Miranda *et al.*, 2001; Spreng *et al.*, 2001; Ersoy *et al.*, 2002).

El nitrito es el único producto estable resultante de la autooxidación del  $\text{NO}$  en soluciones acuosas. El nitrato en cambio, se forma por la reacción entre el  $\text{NO}$  y la oxihemoglobina, lo que implica que el nitrato existe en mayor proporción en plasma y suero. El nitrito en cambio, está en mayor proporción en fluidos que normalmente no contienen sangre, tales como el líquido céfalo-raquídeo y el LS. Se ha establecido una alta correlación entre la producción de  $\text{NO}$  y los niveles de nitrito o nitrato en plasma, suero y orina, y su medición permitiría estimar la producción real de  $\text{NO}$  *in vivo* (Stichtenoth y Frölich, 1998; Miranda *et al.*, 2001; Ersoy *et al.*, 2002).

En estudios previos se han encontrado altos niveles de nitrito+nitrato en el suero y en el LS de pacientes humanos con RA, EDA y en animales con EDA inducida experimentalmente o con artritis autoinmune (Ersoy *et al.*, 2002). También se ha cuantificado nitrito en el suero y en el LS de humanos, encontrándose aumentado en pacientes con EDA o artritis reumatoídea en comparación con pacientes normales, separando grupos por edad y por sexo. En todos los grupos analizados, el nitrito se encontró más concentrado en el LS que en el suero, indicando producción de  $\text{NO}$  intraarticular (Stichtenoth y Frölich, 1998).

En este estudio interesa medir la concentración de nitrito tanto en el LS como en el suero de equinos, utilizando un modelo articular inflamatorio *in vivo* y espontáneo, con el fin

de establecer si la disminución de cartílago articular en el caso de los cuadros crónicos reagudizados (considerando que el condrocito es una fuente de  $\text{NO}$ ), afecta la concentración de nitrito en el LS en comparación con los cuadros agudos que presentan un cartílago articular más íntegro, y si esto tiene alguna correspondencia con los valores séricos de nitrito.

# **HIPÓTESIS**

La concentración de nitrito en el LS y en el suero sanguíneo de equinos será mayor en aquellos animales que cursen procesos inflamatorios articulares agudos, en relación a los crónicos reagudizados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Medir y comparar la producción de  $\text{NO}$  en la patología articular aguda y crónica reagudizada, a través de la medición del contenido de nitrito en el suero sanguíneo y LS de la articulación carpal equina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estandarizar la metodología que permita medir la concentración de nitrito en el suero sanguíneo.
- Cuantificar la concentración de nitrito en el LS de la articulación carpal y en el suero de equinos Fina Sangre de Carrera (FSC).
- Comparar la concentración de nitrito en el suero sanguíneo y el LS entre procesos articulares agudos y crónicos reagudizados.

# **MATERIAL Y MÉTODO**

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

En este trabajo se utilizó LS obtenido por artrocentesis, desde la articulación carpal con inflamaciones aguda de distinto origen y patología crónica reagudizada de equinos FSC desde el Hipódromo Chile. Para los casos agudos se utilizaron principalmente cuadros de sinovitis y/o fracturas en chip (n = 10), considerando como agudo a todo aquel caso que no presentaba antecedentes anamnésicos de lesión previa ni signos radiológicos compatibles con cuadros crónicos al momento de obtener la muestra, mientras que para los casos de patología crónica con reagudización (n = 15) se incluyeron principalmente cuadros de EDA reagudizada de la articulación carpal, diagnosticadas radiológicamente. Se incluyen en este grupo algunos animales que sin tener un diagnóstico radiológico, poseían antecedentes clínicos de cronicidad del cuadro. Además se obtuvo LS de equinos FSC con sus articulaciones clínicamente normales y sin antecedentes radiográficos (n = 3), los cuales sólo se tomaron como referencia y cuyo origen fue la Escuela Militar.

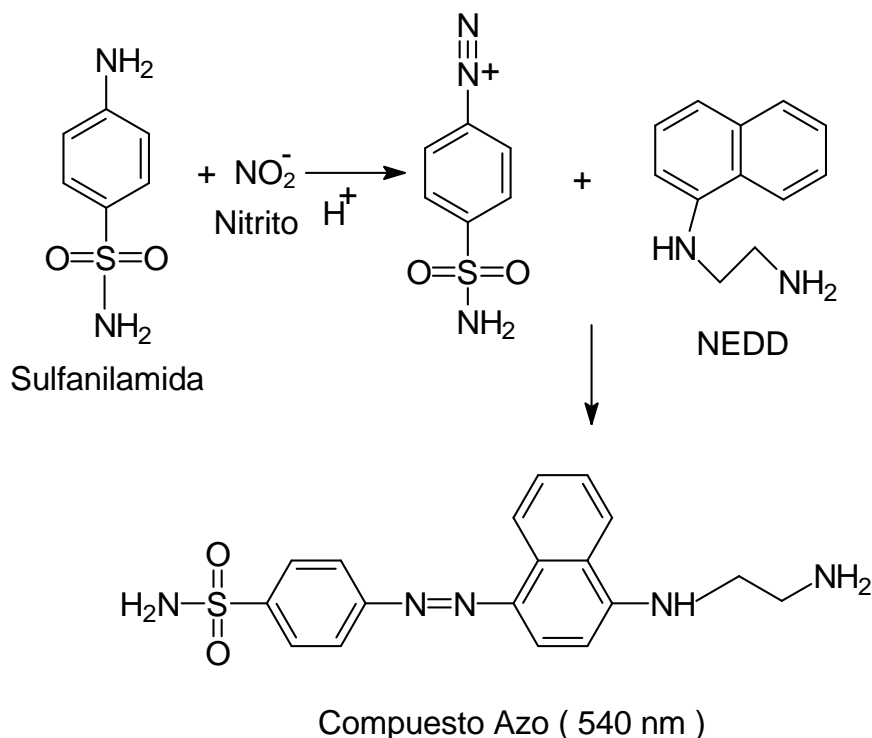
Las muestras de sangre se obtuvieron por venipuntura sin anticoagulante desde los mismos ejemplares.

Además se obtuvo muestras de sangre de equinos sin antecedentes de claudicación (n = 10) cuyo origen fue el Hipódromo Chile. En este grupo de equinos fue imposible obtener muestras de LS debido al alto costo de los animales y al riesgo de generar una enfermedad iatrogénica.

Una vez obtenidas las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se alicuotaron y se conservaron congelados a -20°C hasta su procesamiento, en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad.

## DETERMINACIÓN DE NITRITO

Para determinar la concentración de nitrito en las muestras (LS y suero) se utilizó la metodología descrita por Miranda *et al.*,(2001) basada en la reacción de Griess, que es la metodología más común para cuantificar nitrito debido a que es específica y por lo tanto no detecta nitrato, además de ser simple en su montaje y no necesitar de una instrumentación muy costosa, lo que la hace aplicable de forma rutinaria a un gran número de medios de cultivos celulares y de muestras biológicas que incluyen suero, líquido céfalo-raquídeo y orina (Moshage, 1997; Miranda *et al.*, 2001). Dicha reacción implica la formación de un cromóforo resultante de la asociación de la sulfanilamida con nitrito en medio ácido seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro, como se muestra en el siguiente esquema.



## **DESPROTEINIZACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se ha descrito que la reacción de Griess podría afectarse por compuestos tales como los S-Nitrosotioles y derivados de la L-arginina, por lo cual se recomienda la desproteización de las muestras (Miranda *et al.*, 2001). Para lograr esto se estableció una dilución con etanol en una proporción suficiente, la cual fue determinada experimentalmente, sometiendo muestras de suero y LS a diluciones en proporción de 1:2; 1:4; 1:7; 1:8, y 1:10, y midiendo posteriormente la concentración de proteínas por el método de Lowry *et al.*, (1951) en el sobrenadante obtenido después de centrifugar la mezcla a una velocidad de 1700 x g durante 15 minutos.

## **CONCENTRACIÓN DE NITRITO A TRAVÉS DEL TIEMPO Y SEGÚN**

### **CONDICIONES DE MANEJO**

Para evaluar la concentración de nitrito en las muestras a través del tiempo, y para saber si el manejo de la muestra afectaba su concentración, se compararon dos condiciones distintas de conservación de las muestras de LS y de suero sanguíneo.

Para esto se descongeló un conjunto de muestras de LS y de suero sanguíneo mantenidas durante meses a -20°C formando un “pool” para cada una de ellas a los que se les determinó la concentración de nitrito. Posteriormente cada pool se dividió en dos partes; una parte se mantuvo en refrigeración y la otra en congelación por espacio de 6 días, al cabo de los cuales se determinó nuevamente la concentración de nitrito para ambas muestras por el método de Griess.



## **CONCENTRACIÓN DEL NITRITO EN EL SOBRENADANTE DE MUESTRAS DESPROTEINIZADAS**

Para determinar la concentración de nitrito en el tiempo, en ausencia de proteínas, se procedió a desproteínizar una muestra de LS y otra de suero sanguíneo, ambas provenientes del mismo animal. Luego se determinó la concentración de nitrito en el sobrenadante de ambas muestras. Después el sobrenadante de cada muestra se separó en dos partes, que se mantuvieron en refrigeración para medir la concentración de nitrito al día 2 y al día 6 de refrigeración por el método de Griess.

### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO**

El sobrenadante de cada muestra desproteínizada se dividió en 3 alícuotas de 300  $\mu$ L (triplicado) en tubos Eppendorf diluidos con 300  $\mu$ L de agua destilada. A continuación se agregó a cada uno de los tubos 300  $\mu$ L de reactivo de Griess, el cual fue preparado con una relación de 1:1 de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (NEDD) 0,1% p/v, y sulfanilamida (SULF) 2% p/v, en HCl al 5%. La mezcla se homogeneizó, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se determinó su absorbancia a 540 nm.

Para determinar la concentración de nitrito se preparó una curva estándar con  $\text{NaNO}_2$  0,1 mM en cantidades desde 9 y hasta 100  $\mu$ L (entre 0.069  $\mu$ g y 0.69  $\mu$ g de  $\text{NaNO}_2$ ) utilizando como blanco agua destilada y reactivo de Griess. De esta manera se construyó una regresión lineal con los valores obtenidos a partir de los tubos estándar estimándose la concentración de nitrito en la muestra sustituyendo el dato de la absorbancia de cada muestra en la fórmula, expresando los datos como  $\mu$ moles/L de nitrito.

## **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS**

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se usó el método colorimétrico de Lowry *et al.*, (1951). Para esto se diluyeron las muestras tanto de LS como de suero sanguíneo en agua destilada en una relación de 1:10, y se trabajó en triplicado.

Una vez diluida la muestra, se procedió a agregar alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de ella en tubos de ensayo, a los que luego se les agregó 190  $\mu\text{L}$  de agua destilada, para completar un volumen de 200  $\mu\text{L}$ . A continuación se agregó 1 mL de una solución que contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , tartrato de sodio y potasio, y  $\text{CuSO}_4$ . Esta solución se preparó mezclando 9,8 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en  $\text{NaOH}$  0,1 N, con 100  $\mu\text{L}$  de Tartrato de sodio y potasio 2% y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  1%, para 10 mL de solución final.

Luego la mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se agregó 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin, preparado en una proporción de 1:2 con agua destilada. La mezcla se homogeneizó y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos, determinando su absorbancia a 750 nm.

En cada medición se construyó una curva estándar con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) cuya concentración es de 1 mg/mL, usando volúmenes desde 5 hasta 50  $\mu\text{L}$ .

Los resultados obtenidos se expresaron en mg proteína/mL de muestra biológica.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores promedio de nitrito, tanto del LS como del suero se compararon entre los grupos analizados, estableciéndose el nivel de significancia ( $p < 0,05$ ) a través de un análisis de varianza y posteriormente por la prueba de Tukey Alfa (InfoStat, 2004).

# **RESULTADOS**

## **1.- DISTRIBUCIÓN DE EDADES EN LOS GRUPOS**

En este trabajo se seleccionó en el Hipódromo Chile a un total de 25 equinos FSC con inflamación de la articulación carpal, cuyo promedio de edad fue de  $4,3 \pm 1,5$  años. Las articulaciones inflamadas se dividieron en procesos agudos y en procesos reagudizados de cuadros crónicos. De estos animales se obtuvo LS desde la articulación carpal y además sangre por punción yugular.

El promedio de edad de los animales para los cuadros agudos fue de  $3,8 \pm 1,1$  años, mientras que para los cuadros crónicos reagudizados fue de  $4,6 \pm 1,6$  años. No se encontró diferencia significativa entre estos dos grupos ( $p > 0,05$ ).

Además en el Hipódromo Chile se seleccionó un grupo de equinos con articulaciones sanas clínica y radiológicamente, con edades entre 2 y 4 años y un promedio de  $2,4 \pm 0,8$  años ( $n = 10$ ), desde los cuales sólo se pudo obtener muestras de sangre.

También se obtuvo LS y sangre desde un grupo de equinos de la Escuela Militar clínicamente sanos, sin antecedentes radiológicos, pero con un promedio de edad de  $10,7 \pm 4$  años ( $n = 3$ ).

## **2.- CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LS Y SUERO SANGUÍNEO**

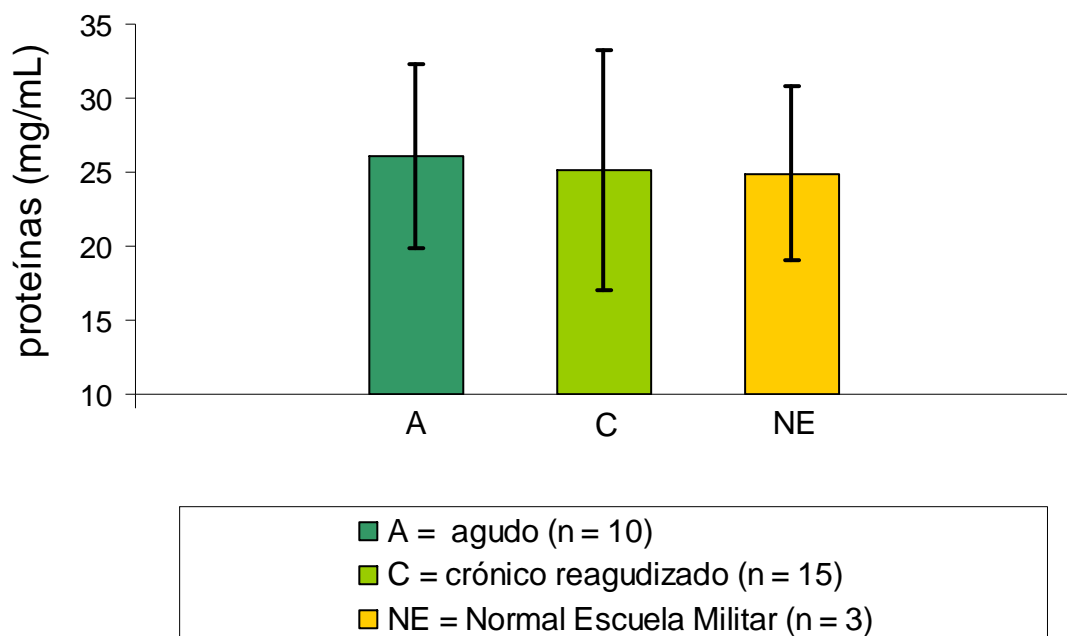
La concentración promedio de proteínas en el LS en el cuadro agudo fue de  $26,1 \pm 6,2$  mg/mL, y en el cuadro crónico reagudizado fue  $25,2 \pm 8,1$  mg/mL. Para el grupo de los animales

normales de la Escuela Militar fue de  $24,9 \pm 5,9$  mg/mL. No se encontraron diferencias entre los grupos analizados.

No se determinó la concentración de proteínas en LS para el grupo de articulaciones sanas del Hipódromo Chile, debido a que no se logró obtener muestras de LS en este grupo de equinos.

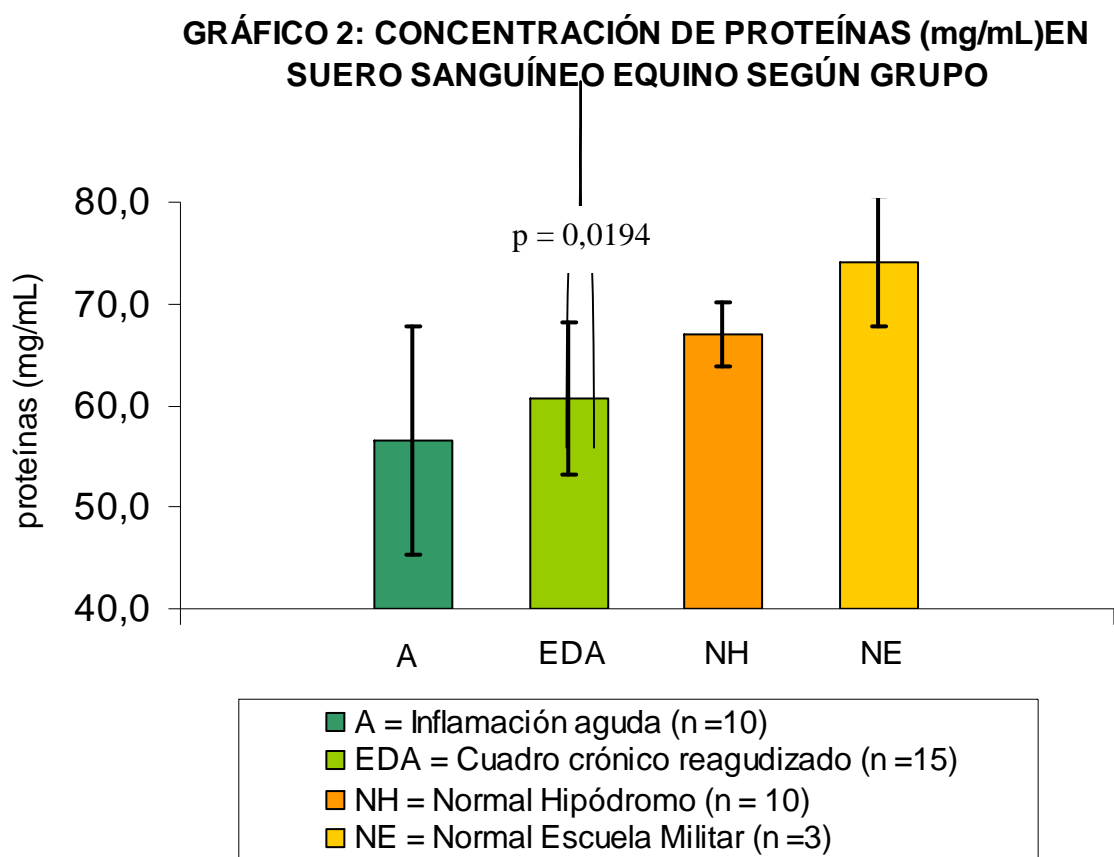
En el gráfico 1 se muestra el valor promedio de proteína en LS para los distintos grupos de animales.

**GRÁFICO 1: CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (mg/mL) EN LS CARPAL EQUINO SEGÚN GRUPO**



La concentración promedio de proteínas en el suero sanguíneo fue de  $56,5 \pm 11,2$  mg/mL en el grupo agudo, de  $60,7 \pm 7,5$  mg/mL para el grupo crónico reagudizado, y de  $67,0 \pm 3,0$  mg/mL en el grupo normal del Hipódromo. Sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo agudo y normal del Hipódromo ( $p = 0,0194$ ), pero a favor del grupo normal. En grupo de referencia de la Escuela Militar el promedio fue de  $74,1 \pm 6,4$  mg/mL.

En el gráfico 2 se observa el valor promedio de proteínas en el suero sanguíneo para cada uno de los grupos analizados.

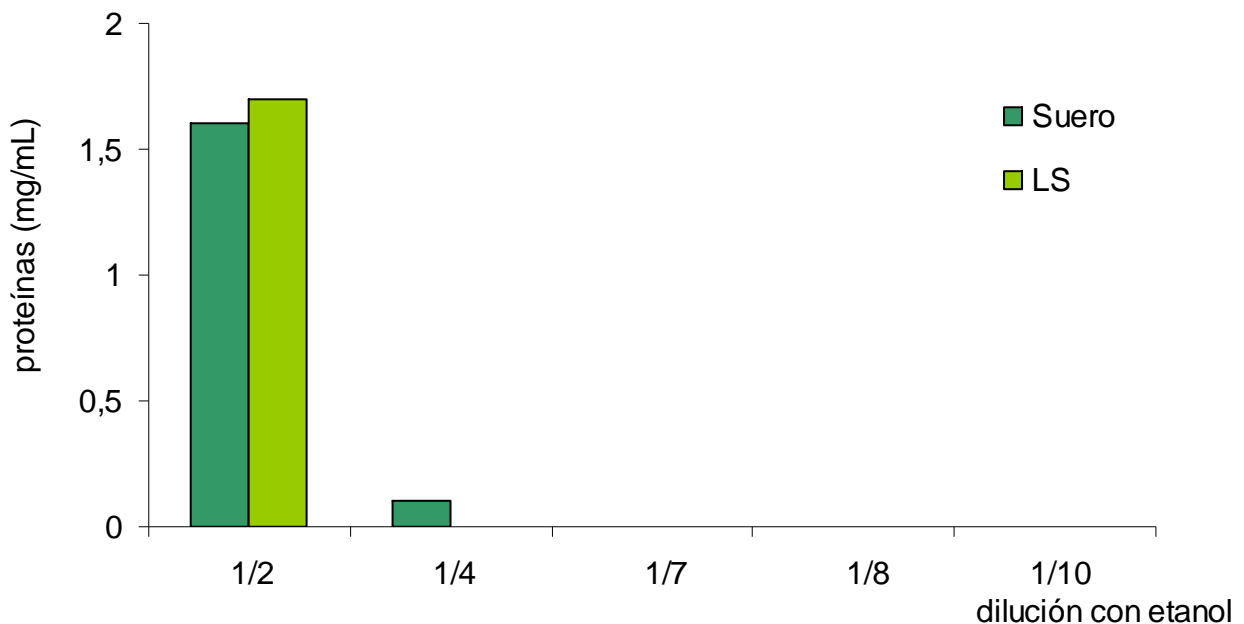


**3.- ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA MEDIR LA  
CONCENTRACIÓN DE NITRITO EN SUERO SANGUÍNEO**

**DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN PARA DESPROTEINIZAR LAS MUESTRAS**

Con el objetivo de eliminar las proteínas por precipitación se sometió un “pool” de LS y de suero sanguíneo a diluciones con etanol de 1:2; 1:4; 1:7; 1:8 y 1:10, centrifugando luego la mezcla a una velocidad de 1700 x g durante 15 minutos, y midiendo la concentración de proteínas en el sobrenadante a través del método colorimétrico de Lowry *et al.*, (1951), encontrándose que con una dilución 1:7 no se detectan proteínas en el sobrenadante. Por lo tanto esta dilución (1:7) fue la que se utilizó para desproteínizar las muestras de LS y de suero. En el gráfico 3 se muestran los resultados de esta prueba.

**GRÁFICO 3: CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (mg/mL) EN EL SOBRENADANTE DESPROTEINIZADO DE LS Y SUERO SANGUÍNEO A DISTNTAS DILUCIONES CON ETANOL**

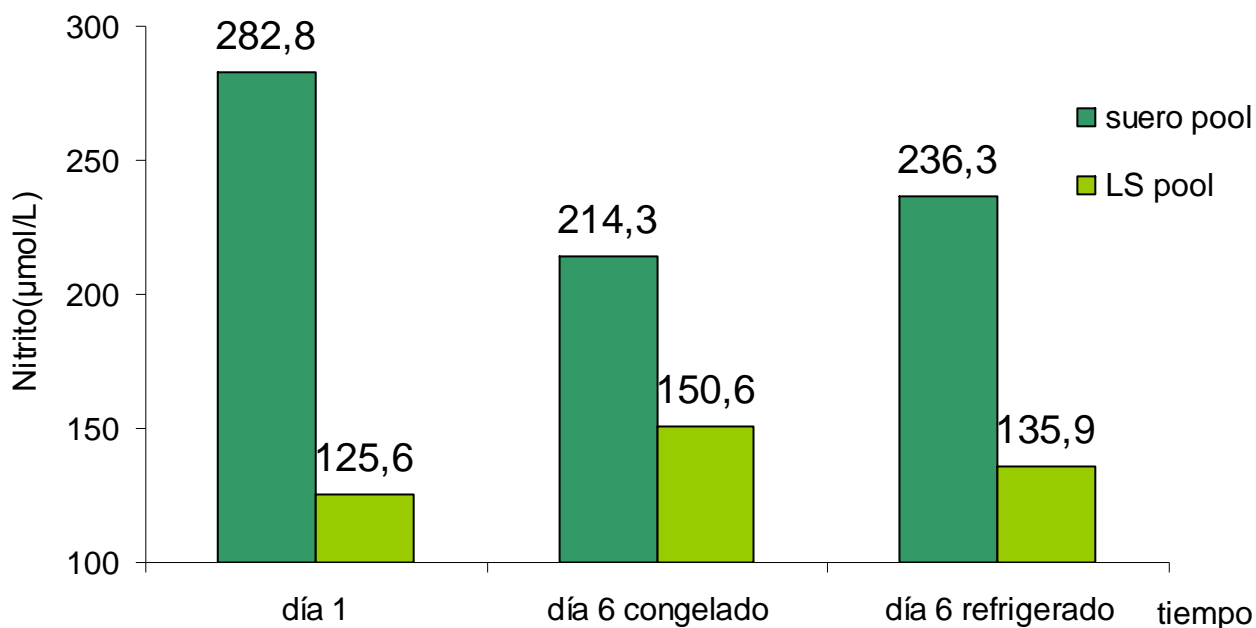


## **CONCENTRACIÓN DEL NITRITO EN EL TIEMPO Y SEGÚN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

Con el objetivo de evaluar la concentración del nitrito en LS y suero sanguíneo a través del tiempo y en diferentes condiciones de conservación de la muestra, se comparó la congelación y descongelación sucesivas con la conservación a temperatura de refrigeración. Para esto se utilizó un “pool” con varias muestras de LS y otro con suero sanguíneo. Las muestras de LS se obtuvieron desde la articulación metacarpo-falángica de equinos FSC, y las muestras de suero sanguíneo desde los mismos ejemplares, permaneciendo todas ellas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un periodo prolongado. Una vez determinada la concentración de nitrito la muestra se dividió, congelando nuevamente una parte de ella a  $-20^{\circ}\text{C}$  y la otra parte se mantuvo en refrigeración. Luego de 6 días se determinó la concentración de nitrito por triplicado para ambas condiciones de conservación, obteniéndose los valores promedio que se muestran en el gráfico 4.

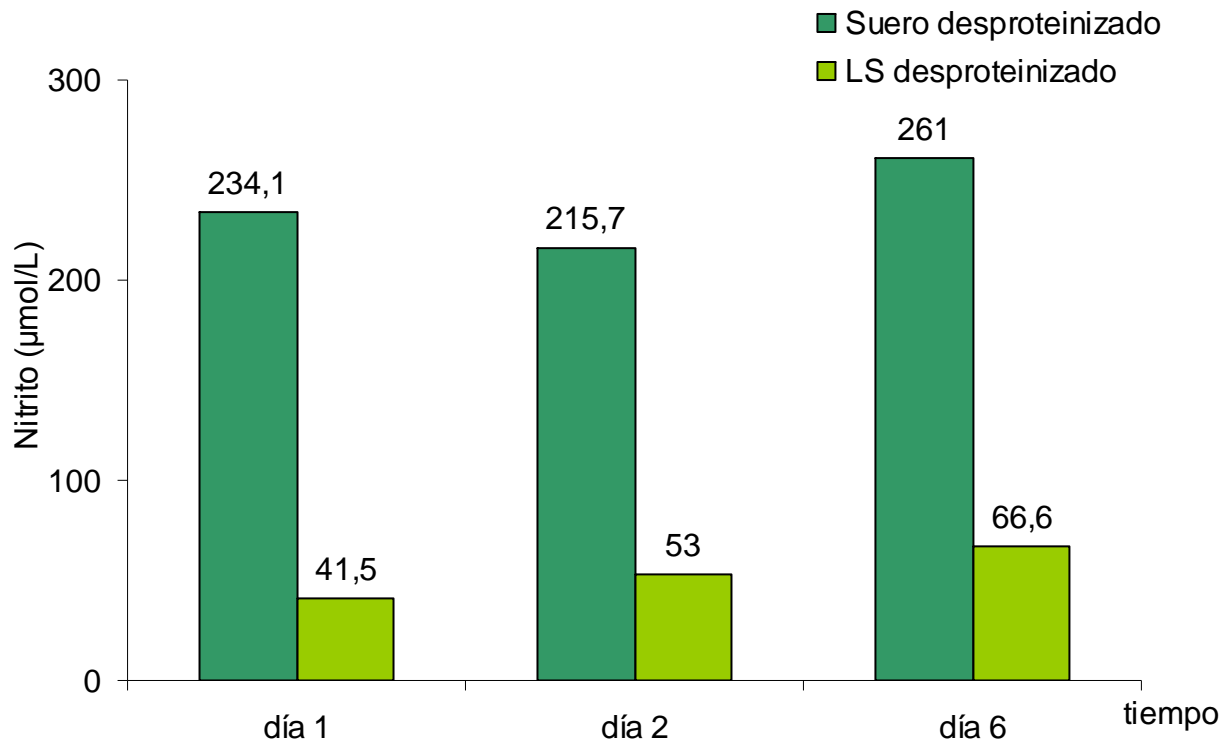


**GRÁFICO 4: CONCENTRACIÓN DE NITRITO ( $\mu\text{mol/L}$ ) EN LS DE ARTICULACIÓN METACARPO-FALÁNGICA Y SUERO SANGUÍNEO DE EQUINO EN EL TIEMPO Y SEGÚN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**



Además se evaluó la concentración del nitrato en el sobrenadante de muestras desproteinizadas. Para esto se utilizó LS de una articulación metacarpo-falángica de equino FSC y el suero sanguíneo del mismo animal, que permanecieron congeladas durante un periodo prolongado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron descongeladas y luego desproteinizadas midiéndose la concentración de nitrato por triplicado. Los sobrenadantes de ambas muestras fueron divididos y almacenados en condiciones de refrigeración, midiendo la concentración de nitrato en ambas muestras, por triplicado, al día 2 y al día 6. Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico 5.

**GRÁFICO 5: CONCENTRACIÓN DE NITRITO ( $\mu\text{mol/L}$ ) EN EL SOBRENADANTE DE LS Y SUERO SANGUÍNEO EQUINO DESPROTEINIZADOS Y ALMACENADOS EN REFRIGERACIÓN**



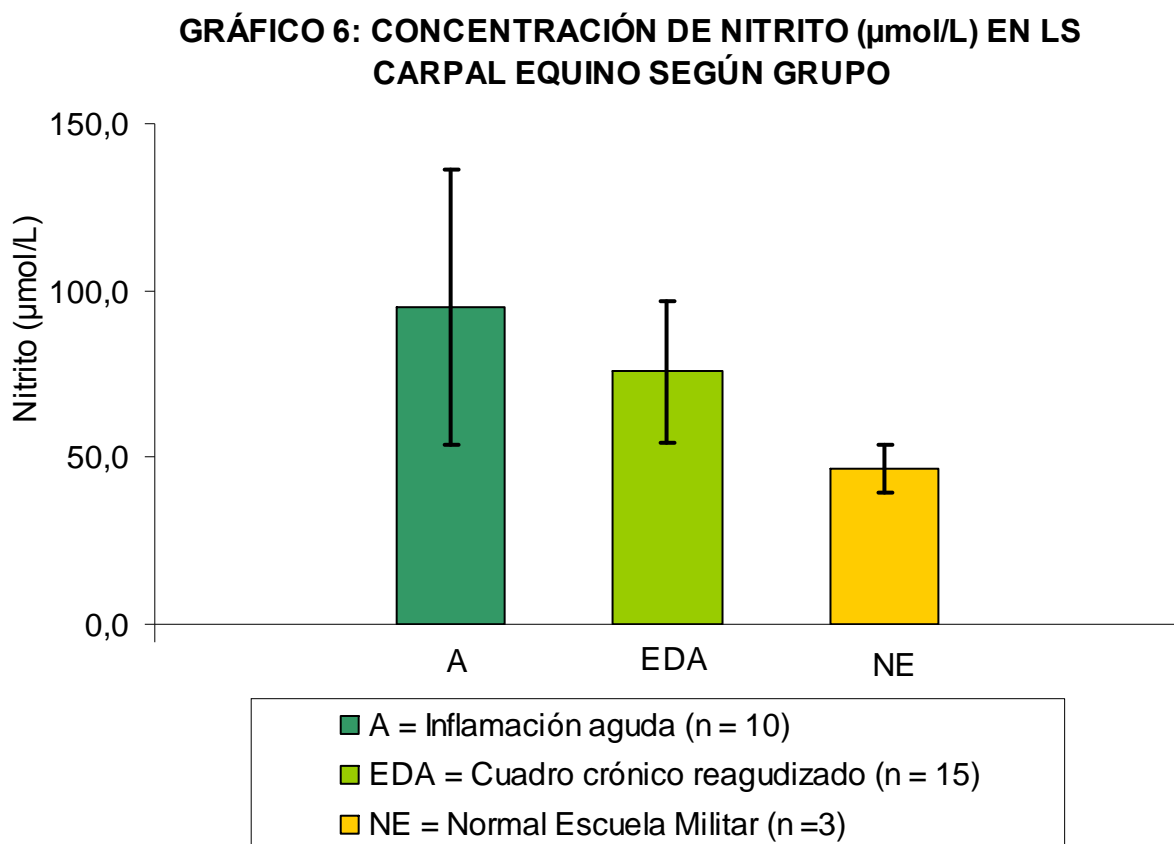
**4.- CONCENTRACIÓN DE NITRITO EN LÍQUIDO SINOVIAL DE CARPO EQUINO**

Para realizar esta medición se utilizaron los grupos agudo, crónico reagudizado, y como referencia se utilizó al grupo normal de la Escuela Militar.

Se obtuvo un promedio de  $95,1 \pm 41,4 \mu\text{mol/L}$  en el grupo agudo, de  $75,8 \pm 21,2 \mu\text{mol/L}$  en el grupo crónico reagudizado y en el grupo normal de referencia se obtuvo un promedio de  $46,7 \pm 7,1 \mu\text{mol/L}$ .

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedio de nitrato en LS entre los grupos agudo y crónico con reagudización ( $p = 0,1394$ ).

En el gráfico 6 se observa el valor promedio de nitrato para los tres grupos de animales.



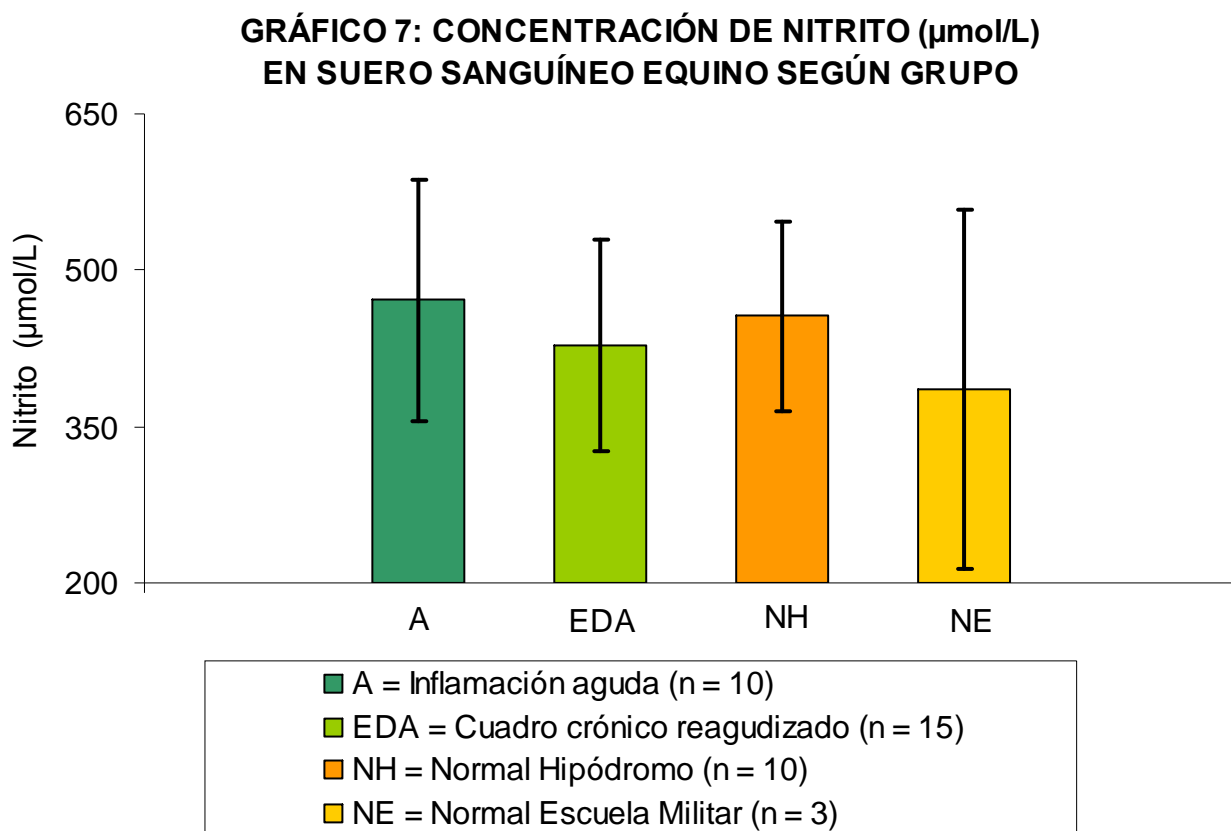
## **5.- CONCENTRACIÓN DE NITRATO EN SUERO SANGUÍNEO EQUINO**

Se midió en el suero de los mismos grupos de animales considerados para LS, pero se agregó el grupo normal del Hipódromo.

Se obtuvo valores promedio de  $471,4 \pm 115,4 \mu\text{mol/L}$  para el grupo agudo, de  $362,8 \pm 157 \mu\text{mol/L}$  para el grupo crónico reagudizado, de  $386,4 \pm 172,3 \mu\text{mol/L}$  para el grupo normal de la Escuela Militar y de  $455,9 \pm 91,1 \mu\text{mol/L}$  para el grupo normal del Hipódromo.

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en el contenido de nitrito del suero sanguíneo entre estos grupos ( $p > 0,05$ ).

En el gráfico 7 se observa el valor promedio de nitrito en el suero sanguíneo para cada uno de los grupos analizados.



En la tabla 1 se resumen los valores promedios y las desviaciones estándar para cada una de las mediciones realizadas en los distintos grupos.

**TABLA 1: DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO ( $\mu\text{mol/L}$ ) Y DE PROTEÍNA ( $\text{mg/mL}$ ) POR TIPO DE MUESTRA, SEGÚN GRUPO.**

GRUPOS CLÍNICOS	n	NITRITO ( $\mu\text{mol/L}$ )				PROTEÍNA ( $\text{mg/mL}$ )			
		Líquido Sinovial		Suero		Líquido Sinovial		Suero	
		Prom.	D. E.	Prom.	D. E.	Prom.	D. E.	Prom.	D. E.
Agudo	10	95,1	41,4	471,4	115,4	26,1	6,2	56,5	11,2
Crónico	15	75,8	21,2	427,9	101,9	25,2	8,1	60,7	7,5
Normal Escuela Militar	3	46,7	7,1	386,4	172,3	24,9	5,9	74,1	6,4
Normal Hipódromo	10	...	...	455,92	91,1	...	...	67,0	3,0

# DISCUSIÓN

En esta memoria de título se utilizó LS y suero sanguíneo de equinos FSC con procesos inflamatorios espontáneos de carpo, a diferencia de otros trabajos realizados en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile, que han utilizado LS obtenido de la articulación metacarpo-falángica de equinos mestizos de matadero con procesos articulares de tipo degenerativo y no inflamatorio (Adarmes *et al.*, 2003; Adarmes *et al.*, 2006). La ventaja del modelo utilizado es la de conocer el historial clínico de los animales, situación que es improbable para el caso de animales de matadero.

En este trabajo se observó que el promedio de edad de los grupos agudo ( $3,8 \pm 1,1$  años) y crónico reagudizado ( $4,6 \pm 1,6$  años) es igual. Esto era esperable, debido a lo prematuro del inicio de la actividad competitiva de estos animales en los Hipódromos, al trauma articular provocado por las velocidades que alcanzan de hasta 60 Km/hr, y a que en algún momento del paso, todo el peso del animal y del jinete es soportado por las articulaciones de un solo miembro. Todo esto puede derivar en problemas degenerativos antes de los 4 ó 5 años de edad; más aun, si un tratamiento común para muchos cuadros de claudicación es la infiltración reiterada de la articulación con glucocorticoides, que provocan finalmente degradación de la matriz extracelular del cartílago articular y el consiguiente cuadro de EDA.

Con el fin de conformar un grupo normal en el Hipódromo ( $n = 10$ ), se escogieron equinos sin antecedentes previos de lesión articular que correspondieron casi exclusivamente a ejemplares que aun no competían, y cuyo promedio de edad fue de  $2,4 \pm 0,8$  años. Desde este grupo sólo fue posible obtener muestras de sangre. Por otro lado, se utilizó otro grupo normal de referencia que se obtuvo desde la Escuela Militar, que está formado por ejemplares de

mayor edad ( $10,7 \pm 4$  años) sin antecedentes de lesión articular ( $n = 3$ ), lo que no implica la ausencia de algún problema agudo o crónico, de tipo subclínico, debido a que están sujetos a la actividad de salto. Desde este grupo se obtuvo muestras de LS desde la articulación carpal, así como también de sangre.

En relación al trabajo experimental y con el objetivo de establecer si las condiciones de conservación de las muestras podrían afectar la estabilidad del nitrito, éstas se sometieron a congelación y descongelación sucesivas, encontrándose que la concentración de nitrito en el suero sanguíneo disminuyó de  $282,2 \mu\text{mol/L}$  hasta  $214,3 \mu\text{mol/L}$  luego de 6 días de congelación, pero esta disminución fue leve al mantener la muestra refrigerada por 6 días ( $236,3 \mu\text{mol/L}$ ). En el caso de la concentración de nitrito en el LS se detectó una mayor estabilidad en el tiempo. Moshage *et al.*, (1995) evidenciaron la disminución de la concentración de nitrito en el plasma sanguíneo a través del tiempo en comparación con la concentración que existía al momento de la obtención de la muestra, pero estas pruebas no consideraron descongelaciones sucesivas sino solamente la determinación de la concentración de nitrito al momento de la obtención de la muestra que se comparó con la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1, 3, 6, 9 y 12 meses, describiendo además que el tiempo de almacenamiento no genera variación en la determinación entre ellas. En el presente trabajo se evaluaron muestras de LS y suero sanguíneo que permanecieron por largo tiempo en congelación encontrándose que su manejo posterior de conservación en congelación o bien en refrigeración no afectó mayormente la estabilidad del nitrito. Las muestras utilizadas en este trabajo se mantuvieron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre 6 a 18 meses hasta su procesamiento.

Debido a que se ha descrito que los S-nitrosotioles de la sangre (proteínas con grupos SH que pueden unirse a  $\cdot\text{NO}$  en la sangre) pueden ser una fuente de  $\cdot\text{NO}$  a medida que éste se disocia desde la proteína, generando un aumento en la concentración de  $\cdot\text{NO}$  en la sangre y en

consecuencia de nitrito (Stamler, 2004), se decidió además evaluar la concentración de nitrito en LS y suero sanguíneo desproteinizado, encontrándose cierta estabilidad en las mediciones de concentración de nitrito a lo largo del tiempo.

La concentración de nitrito no experimentó mayores cambios de acuerdo a las condiciones de conservación y manejo descritas. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados no comparan las concentraciones de nitrito de las muestras almacenadas con la que existía en las mismas muestras al momento de su obtención, por lo que no se puede hablar de un estudio de estabilidad.

La concentración de proteínas en LS no mostró diferencia significativa entre los grupos agudo ( $26,1 \pm 6,2$  mg/mL) y con EDA reagudizado ( $25,2 \pm 8,1$  mg/mL) lo que se explica por el cuadro inflamatorio de las articulaciones. Estos datos aparecen similares a los aportados por Vásquez (2001), que también usó la articulación carpal y una metodología similar, reportando valores promedio de  $18,19 \pm 4,25$  mg /mL y de  $18,28 \pm 3,5$  mg /mL para los grupos con fractura en chip. Todas las muestras de LS analizadas presentaron algún grado de contenido sanguinolento, de modo que era previsible encontrar una mayor concentración de proteínas debido a la hemoglobina libre, en comparación con las determinadas por Solís (2004), quien encontró concentraciones menores de proteínas en LS de la articulación metacarpo-falángica con cuadros articulares degenerativos no inflamatorios en animales de matadero ( $10,8 \pm 5.4$  mg /mL). El grupo normal de referencia de la Escuela Militar evidenció niveles de proteínas similares ( $24,9 \pm 5,9$  mg/mL) a los mostrados por los grupos agudo y crónico reagudizado aun siendo animales clínicamente normales. Estos valores fueron incluso más altos que los descritos por Vásquez (2001), quien para el grupo de referencia y utilizando animales de matadero, encontró valores de  $9,73 \pm 4,5$  mg/mL. Este grupo de la Escuela Militar tenía un promedio de edad mayor ( $10,7 \pm 4$  años) con respecto al de ambos grupos de animales con



inflamación articular del Hipódromo, lo que podría relacionarse con algún grado de inflamación subclínica debido al tipo de trabajo que realizan, no descartable ya que no fue posible obtener antecedentes radiológicos de estos animales.

La concentración de proteínas del suero sanguíneo no mostró diferencias entre los grupos agudo y crónico reagudizado, pero el grupo normal del Hipódromo presentó una proteinemia mayor y estadísticamente significativa en relación al grupo agudo no asociable a una posible deshidratación por ejercicio ya que este grupo fue muestreado antes de entrenar. Es difícil plantear una explicación a esta diferencia que se podría relacionar al manejo de los animales en el corral.

En relación a la concentración de nitrito en el LS no se encontró diferencia significativa entre los grupos agudo ( $95,1 \pm 41,4 \mu\text{mol/L}$ ) y crónico reagudizado ( $75,8 \pm 21,2 \mu\text{mol/L}$ ) aunque en la literatura se describe un aumento en la producción de  $\text{NO}$  en los grupos con inflamación articular (Stichtenoth y Frölich, 1998; Spreng *et al.*, 2001). Posiblemente con un aumento del tamaño muestral estos valores podrían tener diferencia estadística. Se ha descrito que el cartílago articular sería la principal fuente de  $\text{NO}$  en articulaciones humanas y caninas con procesos degenerativos debido a la expresión de la NOS-II por los condrocitos (Spreng *et al.*, 2001), y de acuerdo a esto una articulación con EDA que presenta una pérdida de cartílago articular, debiera producir una menor cantidad de  $\text{NO}$  que una articulación afectada por un cuadro inflamatorio agudo. Por otro lado, en una articulación inflamada aparece una gran cantidad de células inflamatorias infiltradas, las cuales también tienen la capacidad de expresar la NOS-II (Murrell *et al.*, 1995; Moshage, 1997; Ralston, 1997; Stichtenoth y Frölich, 1998; Davis *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2001). De esta forma una articulación inflamada con o sin daño articular previo, podría presentar una producción

elevada de  $\text{NO}$  que podría estar asociada a la infiltración de células inflamatorias y a la síntesis por parte del cartílago.

Los valores de nitrito en LS en ambos grupos patológicos son más elevados que los descritos por Solís (2004), quien descartó LS hemorrágicos o provenientes de articulaciones con inflamación, por lo que la producción de  $\text{NO}$  sólo representaría la proveniente desde el cartílago articular con proceso degenerativo.

En relación a la concentración de nitrito en suero sanguíneo no se encontraron diferencias entre los grupos agudo ( $471,4 \pm 115,4 \mu\text{mol/L}$ ), crónico reagudizado ( $362,8 \pm 157 \mu\text{mol/L}$ ) y normal del Hipódromo ( $455,9 \pm 91,1 \mu\text{mol/L}$ ). Esto sugiere que en el modelo que hemos utilizado el nitrito sérico no constituiría un buen reflejo del cuadro inflamatorio articular, ya que probablemente a nivel sistémico existen otras fuentes de  $\text{NO}$  lo que podría enmascarar al producido en las articulaciones. Para la concentración de nitrito en el suero sanguíneo y su relación con la concentración de nitrito en LS, existen datos contradictorios en la literatura describiendo algunos autores una mayor concentración de nitrito en LS (Stichtenoth y Frölich, 1998), y otros como Spreng *et al.*, (2001) una mayor concentración en suero. Los autores que describen mayor concentración de nitrito en LS argumentan que eso indicaría una producción intraarticular de  $\text{NO}$ , asociada a células como los fibroblastos de la membrana sinovial, células endoteliales, macrófagos, y condrocitos, particularmente los superficiales (Stichtenoth y Frölich, 1998).

Ersoy *et al.*, (2002) estudiaron los valores séricos de nitrito en pacientes humanos con diferentes patologías articulares, determinando que los valores séricos de nitrito fueron más altos en pacientes que cursaban con AR o espondilitis anquilosante en comparación con los pacientes con artritis no reumatoídea ( $4,9$ ;  $6,1$ ;  $3,4 \mu\text{mol/L}$  respectivamente). Además el valor

de nitrito fue mayor en cualquiera de los grupos patológicos en comparación con el grupo control (1,7  $\mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0,01$ ).

La medición de nitrito+nitrato en la orina, plasma o suero sanguíneo, LS y otros líquidos biológicos se ha usado como marcador entre otras patologías de enfermedad inflamatoria entérica, artritis y gastroenteritis. Sin embargo, las mediciones entre individuos y en un mismo individuo son altamente variables. Factores que influirían en la variación de estas mediciones serían el  $\text{NO}$  inhalado desde la atmósfera, el metabolismo del ciclo de la urea, la difusión de  $\text{NO}$  desde distintos sitios del tracto gastrointestinal, y la reducción endógena de nitrato a nitrito por los tejidos de los animales. Se ha establecido que el  $\text{NO}$  también se puede generar en el medio ambiente ácido del estómago de una manera no enzimática, y farmacológicamente por compuestos tales como la nitroglicerina y otros vasodilatadores (Moshage, 1997; Ralston, 1997; Stichtenoth y Frölich, 1998; Spreng *et al.*, 2001).

En este trabajo la concentración de nitrito sérico es mayor en todos los grupos analizados con respecto a los trabajos antes descritos (Stichtenoth y Frölich, 1998; Spreng *et al.*, 2001), situación que podría relacionarse con la diferente actividad de la NOS endotelial entre las distintas especies. Por otro lado, para explicar el mayor nivel de derivados del  $\text{NO}$  en el suero sanguíneo se ha citado como causa a la diferencia en la metodología que se ha usado para su medición, reportándose variaciones entre distintos trabajos de hasta 1000 veces la concentración de  $\text{NO}$  en LS (Spreng *et al.*, 2001).

Spreng *et al.*, (2001) describieron que en perros con artropatías se incrementaba el valor de nitrito+nitrato en el suero sanguíneo en relación al grupo control (45,6 y 28,9  $\mu\text{mol/L}$ ;  $p = 0,042$ ), pero en el LS no encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Debido a que la hemoglobina puede oxidar rápidamente el nitrito de la sangre a la forma de nitrato y considerando el tiempo que tardan los laboratorios en procesar las muestras,

el nitrito no sería detectable después de unas horas (Moshage *et al.*, 1995), lo que se minimizó en este trabajo al centrifugar y eliminar la fracción celular de la sangre inmediatamente después de obtenida la muestra. Sin embargo si *in vivo* hay un LS sanguinolento, el nitrito generado se oxidaría también. Así, para algunos autores, tendría más relevancia la medición de nitrito+nitrato ya que esta última se mantiene mucho mas estable en el tiempo que la concentración de nitrito solamente.

El modelo utilizado en este trabajo presenta fuentes de variación tales como los manejos a los cuales puedan ser sometidos los animales en el corral, o la producción sistémica de  $\text{NO}$  por parte del tejido endotelial, que podrían afectar la interpretación de las mediciones realizadas. Estudios futuros que consideren estos aspectos, como por ejemplo el hacer un estudio comparativo entre animales de Hipódromo y de matadero en forma simultánea podrían ayudar a dilucidar si estos factores son realmente influyentes en los valores obtenidos, así como en la interpretación de los resultados. Además se podría considerar la preñez, la edad y el sexo como factores a analizar.

El papel que juega el  $\text{NO}$  en la patogenia de la EDA aun es incierto, así como también su uso, o el de sus metabolitos, como herramienta diagnóstica en la clínica del equino. Por otro lado, los datos obtenidos en condiciones de laboratorio atribuyen al  $\text{NO}$  un rol importante en la homeostasis del cartílago. La medición simultánea de la concentración de nitrito y nitrato podría aportar nuevos antecedentes en relación a la participación del  $\text{NO}$  en la patogenia de la EDA y la inflamación articular aguda, así como también monitorear sus variaciones a través del tiempo.

# **CONCLUSIONES**

- La concentración de nitrito en el LS no aumentó significativamente en los cuadros agudos en comparación con los crónicos reagudizados, para este tamaño muestral.
- La concentración de nitrito en el suero sanguíneo no difiere entre los grupos analizados lo que sugiere que la concentración de nitrito sérico no sería un buen indicador para distinguir entre procesos articulares agudos y crónicos reagudizados.
- La concentración de nitrito en el suero sanguíneo fue mayor que la del LS en los animales analizados en esta memoria.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- ADARMES, H.; RIVEROS, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZÁLEZ E.** 2003. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpo falángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. Arch. Med. Vet. 35 (1): 51 – 59.
- ADARMES, H.; CROXATTO, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZALEZ, E.** 2006. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehídos y proteínas en el líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. Arch. Med. Vet. 38 (1): 47 – 52.
- BIRD, J.L.E.; MAY S.; BAYLISS, M.T.** 2000. Nitric oxide inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. Equine Vet. J. 32 (2): 133-139.
- CLANCY, R.M.; AMIN, A.R.; ABRAMSON, S.B.** 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis Rheum. 2 (7): 1141 – 1151.
- CLEGG, P. D.; BURKE, R. M.; COUGHLAN, A. R.; RIGGS, C. M.; CARTER S. D.** 1997 a. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; identification of the cellular sources of these enzymes in joints. Equine Vet. J. 29 (5): 335 - 342.
- CLEGG, P. D.; COUGHLAN A. R.; RIGGS C. M.; CARTER S. D.** 1997 b. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. Equine Vet. J. 29 (5): 343 - 348.
- DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; MURAD, F.** 2001. Novel Effects of Nitric Oxide. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41: 203 – 236.
- DIMOCK, A.N.; SICILIANO, P.D.; McILWRATITH, C.W.** 2000. Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. Equine Vet. J. 32 (5): 439 – 443.
- ERSOY, Y.; ÖZEROL, E.; BAYSAL, Ö.; TEMEL, I.; MacWALTER, R.S.; MERAL, Ü.; ALTAY, Z.E.** 2002. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis 61: 76 – 78.
- FÖRSTERMANN, U. ; BOISSEL, J ; KLEINERT, H.** 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). FASEB J. (12): 773–790.
- GARNERO, P.; ROSSEAU, J.C.; DELMAS P.D.** 2000. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. Arthritis Rheum. 43 (5): 953 – 968.

- GETTY, R.** 2000. Sisson y Grossman anatomía de los animales domesticos. Trad por R. Martín Roldán, M. Illera Martín y M.J. Blánquez Layunta. 5ed. Barcelona, Esp. Masson, S.A. 2v.
- GOLDRING, M.B.** 2000. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43 (9): 1916 – 1926.
- GOODSTONE, N.J.; HARDINGHAM, T.E.** 2002. Tumour necrosis factor  $\alpha$  stimulates nitric oxide production more potently than interleukin 1- $\beta$  in porcine articular chondrocytes. *Rheumatology* 41: 883 - 891.
- GRABOWSKI, P.S.; WRIGTH, P.K.; VAN'T HOF, R.J.; HELFRICH, M.H.; OHSHIMA, H; RALSTON, S.H.** 1997. Immunolocalization of inducible nitric oxide sintase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br. J. Rheumatol.* 36: 651 – 655.
- GUNSON, D.E.** 1979. Collagen in normal and abnormal tissues. *Equine Vet. J.* 11 (2): 97 – 101.
- HÉRAUD, F.; HÉRAUD, A.; HARMAND, M-F.** 2000. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 59: 959- 965.
- INFOSTAT.** 2004. InfoStat, versión 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- LEE, M.S.; TRINDALE M.C.D.; IKENOUE, T.; SCHURMAN, D.J.; GOODMAN, S.B.; SMITH, R.L.** 2002. Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.* 20: 556 – 561.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 256 – 275.
- MC ILWRAITH, C.W.** 1996. General pathobiology of the joint and response to injury. In Mc Ilwraith, C.W. *Joint Disease in the Horse.* Philadelphia. W.B. Saunders p. 40- 70.
- MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A.** 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for Simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5 (1): 62 – 71.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; JANSEN, P.L.M.** 1995. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.* 41(6): 892 – 896.
- MOSHAGE, H.** 1997. Nitric Oxide Determinations: Much Ado About 'NO –Thing? *Clin. Chem.* 43 (4): 553-556.

- MURRELL, G.A.C.; JANG, D.; WILLIAMS, R.J.** 1995. Nitric oxide activates metalloproteinase enzymes in articular cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206 (1): 15 – 21.
- NAGASSE, H.; WOESSNER JUNNIOR, J.F.** 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 31 (274): 21491-21494.
- NOTOYA, K.; JOVANOVIC, D.V.; REBOUL, P.; MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; PELLETIER, J.P.** 2000. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E<sub>2</sub> via the induction of cyclooxygenase-2. *J. Immunol.* 165: 3402 – 3410.
- PLATT, D.** 1996. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. *In* Mc Ilwraith, C.W. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia. W. B. Saunders p. 29-40.
- POOLE, A.R.; KOBAYASHI, M.; YASUDA, T.; LAVERTY, S.; MWALE, F.; KOJIMA, T.; SAKAI, T.; WAHL, C.; EL-MAADAWY, S.; WEBB, G.; TCHETINA, E.; WU, W.** 2002. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann. Rheum.* 61 (suppl III): 78 – 81.
- RALSTON, S.H.** 1997. Nitric oxide and bone: What a gas!. *Br. J. Rheumatol.* 36: 831 – 838.
- RECHENBERG, B. VON; MC ILWRAITH, C.W.; AKENS, M.K.; FRISBIE, D.D.; LEUTENEGGER, C.; AUER, J.A.** 2000. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet. J.* 32 (2): 140-150.
- RUOSLAHTI, E.** 1988. Structure and biology of proteoglycans. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4: 229-255.
- SANDELL, L.J.; AIGNER, T.** 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3: 107 – 113.
- SOLÍS, J.P.** 2004. Concentración de nitrito como derivado del óxido nítrico en fluido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. Memoria de Título Med. Vet., Fac. Cs. Vet. y Pec. U. de Chile. 44p.
- SPRENG, D.; SIGRIST, N.; SCHWEIGHAUSER, A.; BUSATO, A.; SCHAWALDER, P.** 2001. Endogenous Nitric Oxide Production in Canine Osteoarthritis: Detection in urine, Serum, and Sinovial Fluid Specimens. *Vet. Surg.* 30: 191 – 199.
- STAMLER, J.S.** 2004. S-nitrosothiols in the blood roles, amounts and method for analysis. *Circ. Res.* 94: 414 – 417.



- STICHTENOTH, D.O.; FRÖLICH, J.C.** 1998. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br. J. Rheumatol.* 37: 146 – 257.
- TODHUNTER, R. J.** 1996. Anatomy and physiology of sinovial joints. **In** Mc Ilwraith, C.W. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia. W. B. Saunders p. 1-28.
- TOMITA, M.; SATO, E. F.; NISHIKAWA, M.; YAMANO, Y.; INOUE, M.** 2001. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 44 (1): 96 – 104.
- VAN'T HOF, R. J.; HOCKING, L.; WRIGHT P. K.; RALSTON, S. H.** 2000. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology* 39: 1004 – 1008.
- VÁSQUEZ, F.A.** 2001. Detección en el líquido sinovial de moléculas de la matriz extracelular del cartílago articular de carpo equino en condiciones de fractura. Memoria de Título Med. Vet., Fac. Cs. Vet. Y Pec. U. de Chile. 68p.