



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

MODIFICACIÓN DEL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DEL
LÍQUIDO SINOVIAL EQUINO MEDIANTE EL USO DE BIBLIOTECAS DE
LIGANDOS COMBINATORIALES

Pablo Fueyo Musso

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

PROFESOR GUÍA: DR. HÉCTOR ADARMES AHUMADA
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

SANTIAGO – CHILE

2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

MODIFICACIÓN DEL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DEL
LÍQUIDO SINOVIAL EQUINO MEDIANTE EL USO DE BIBLIOTECAS DE
LIGANDOS COMBINATORIALES

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: DR. HECTOR ADARMES AHUMADA

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: HECTOR ADARMES	
PROFESOR CORRECTOR: MARCOS GALLEGUILLOS	
PROFESOR CORRECTOR: PEDRO SMITH

SANTIAGO, CHILE

2015

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta memoria de título a mis padres, mis amigos, a Matías y Lara, por su apoyo irrestricto, paciencia y cariño otorgado, sin lo cual no habría sido posible la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hector Adarmes por su guía tanto en lo académico como en lo personal.

Al Profesor Marcos Galleguillos por su disposición a enseñar y su ayuda en la electroforesis.

Al Dr. Pedro Smith por su ayuda a lo largo de mi carrera y por facilitar la tecnología de bibliotecas de ligandos combinatoriales.

Al Sr. Victor Molina por la ayuda en la toma de muestras y en el laboratorio.

RESUMEN

Para el estudio del componente proteico del líquido sinovial equino se propone la implementación de la tecnología de bibliotecas de ligandos combinatoriales, con el fin de disminuir la presencia de proteínas de alta abundancia, como la albúmina, que dificultan el acceso a proteínas de baja abundancia, expresado a su vez en el cambio del patrón electroforético de las proteínas del líquido sinovial. Se exponen los alcances que posee esta tecnología para su uso en líquido sinovial equino y la comparación de protocolos, con el fin de optimizar una metodología en el estudio electroforético de las proteínas del líquido sinovial. Los cambios metodológicos incluidos al protocolo inicial, como captura a diferentes pH, aumento de volumen de muestra y disminución de la fuerza iónica del medio, permiten un mejor resultado en el estudio electroforético del líquido sinovial equino.

Palabras clave: Equino. Líquido sinovial. Bibliotecas de ligandos combinatoriales. Albúmina.

ABSTRACT

For the study of the protein content of equine synovial fluid we propose the implementation of combinatorial peptide ligand libraries technology to deplete high abundant proteins, like albumin, which difficult the access to low abundant proteins, expressed in turn in changes in the equine synovial fluid electrophoretic pattern. We exhibit the extents of this technology for equine synovial fluid use and protocol comparison, to optimize a methodology for the electrophoretic study of equine synovial fluid proteins. Methodology changes in the initial protocol, like different pH values capture, rise volume sample and decrease in media ion strength, allow better results in equine synovial fluid electrophoretic study.

Keywords: Equine. Synovial fluid. Combinatorial peptide ligand libraries. Albumin.

INTRODUCCIÓN

La importancia del equino recae en su capacidad para desarrollar las diferentes funciones que, a lo largo de la historia, han ayudado al ser humano a desenvolverse durante miles de años, ya sea como medio de transporte, actividades del agro, deportes, bélico, e incluso como modelo de estudio de afecciones humanas, particularmente articulares. Para el correcto desarrollo de su función, el equino debe mantener la integridad del sistema locomotor, especialmente de las articulaciones de las extremidades torácicas y pelvianas, las cuales constituyen una de las estructuras más relevantes en cuanto al cuidado del ejemplar, debido a que una lesión articular representa la primera causa de invalidez o reducción de la *performance*, seguido de las lesiones tendinosas (van Weeren, 2014).

Las articulaciones sinoviales son de vital importancia para la biomecánica de las extremidades, facilitando el desplazamiento de estructuras rígidas como son los huesos. Es por ello que las articulaciones dependen de la integridad de sus componentes anatómicos y celulares, como son el hueso subcondral, el cartílago articular, la membrana sinovial, el fluido sinovial, la cápsula articular y ligamentos (Frisbie, 2012).

El estudio de los componentes articulares, sobre todo del fluido sinovial, es de relevancia para entender los procesos patológicos que impactan en el desarrollo de la función de los equinos, y así poder dar mejores aproximaciones diagnósticas y terapéuticas. Comprender a cabalidad la fisiopatología de las enfermedades osteocondrales permite anticipar condiciones patológicas venideras, por lo que, últimamente, el estudio se ha centrado en la búsqueda de biomarcadores en el fluido sinovial que sirvan en el diagnóstico temprano de la enfermedad degenerativa articular (Araya *et al.*, 2010).

Sin embargo, debido a que muchos de estos biomarcadores son proteínas que se encuentran en baja concentración en el fluido sinovial, se ha dificultado su búsqueda producto del enmascaramiento que sufren a causa de proteínas de gran abundancia, como la albúmina (Figura Nro. 1). Para la resolución de esta problemática, se propone para este trabajo el uso de una tecnología, desarrollada para la equalización del contenido proteico del suero sanguíneo humano que se basa en sobreexpresar la porción minoritaria de proteínas y disminuir la cantidad de aquéllas que se encuentran en alta abundancia, lo que podría ser útil en la búsqueda de proteínas que permitan un entendimiento más amplio de la fisiología

articular, el diagnóstico temprano de procesos patológicos e incluso amplíen las opciones terapéuticas.



Figura Nro. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida del fluido sinovial equino. La banda más ancha y de mayor intensidad corresponde a la albúmina. Foto tomada en el laboratorio del Departamento de Ciencias Biológicas Animales.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Componentes del fluido sinovial y membrana sinovial

La membrana sinovial se compone de dos capas, la íntima y la subíntima. La primera es la responsable de contener el fluido sinovial y está compuesta por una a cuatro capas de células, carentes de una membrana basal (Frisbie, 2012). Ésta tiene gran influencia en la composición del fluido sinovial y en la homeostasis articular (van Weeren, 2014).

La segunda capa, la subíntima, está compuesta principalmente de tejido fibroso, laxo y adiposo, que se encuentra bien innervado e irrigado (Frisbie, 2012).

La capa interna o íntima, posee dos tipos de células, que participan en el metabolismo articular de forma activa: Los macrófagos tipo A, también denominadas sinoviocitos tipo A, encargados de la fagocitosis y pinocitosis de los componentes del fluido articular (Frisbie, 2012) y los fibroblastos tipo B, o sinoviocitos tipo B, responsables de la secreción proteica además de ácido hialurónico, componente del contenido del fluido sinovial que le proporciona su viscosidad característica (van Weeren, 2014).

Últimamente se ha descubierto un nuevo tipo de célula, el sinoviocito tipo C, del cual se cree que sería una célula transicional entre el sinoviocito tipo A y el tipo B, o viceversa (van Weeren, 2014).

El fluido sinovial corresponde a un transudado o dializado del plasma sanguíneo que es modificado por el metabolismo articular, mediante la secreción de ácido hialurónico, glicoproteínas y otras moléculas (Mahaffey, 2002). Se caracteriza por un escaso contenido celular, carente de partículas, viscoso o semifluido, de color amarillo levemente transparente (Mahaffey, 2002) e incapaz de coagular debido a la falta de factores de la coagulación (Denton, 2012). De hecho, está sometido a un fenómeno conocido como tixotropismo, que consiste en la gelificación del fluido, que regresa a su forma fluida mediante agitación (Mahaffey, 2002).

El fluido sinovial actúa principalmente como un lubricante biológico y como un *pool* de moléculas que proporcionan la nutrición del ambiente articular (Steel, 2008).

La composición bioquímica del fluido sinovial depende del metabolismo del componente celular de la membrana sinovial, así como también de lo que permita el intercambio entre la

capa subíntima y los capilares fenestrados. Este intercambio ocurre principalmente debido a la particular estructura de la membrana sinovial, carente de membrana basal y de uniones estrechas (Frisbie, 2012), lo que permite el paso de moléculas con un peso molecular igual o menor a 10 kDa (Frisbie, 2012; van Weeren, 2014), dejando libre paso a la glucosa, oxígeno, CO₂ y electrolitos, obstruyendo el paso de moléculas de mayor peso molecular (Steel, 2008; Frisbie, 2012). Sin embargo, Todhunter (1996) describe que si bien el paso de moléculas pequeñas (<10KDa) se da con facilidad, por difusión simple, debido a la falta de membrana basal y las uniones estrechas, ésta no es excluyente del paso de moléculas de mayor peso molecular, lo que explica la presencia de albúmina (67 KDa) (Greve *et al.*, 1987) en el fluido sinovial, pero con una menor concentración respecto del plasma sanguíneo.

Esto determina la similitud bioquímica entre el plasma sanguíneo y el fluido sinovial, a excepción del contenido de fibrinógeno u otros factores de la coagulación (Steel, 2008). Se estima que hay una diferencia en el componente proteico del fluido sinovial, de un 65% a 75% respecto a los valores séricos. Estos últimos oscilan entre 53 y 79 g/L, correspondiendo entre 26 a 37 g/L a la concentración de albúmina, la cual representa alrededor de un 50 % del componente proteico sérico (Crisman *et al.*, 2008). En el líquido sinovial la concentración total de proteína varía dependiendo de los autores y de la articulación muestreada. Así, se han establecido concentraciones de 11±2,1 g/L (Greve *et al.*, 1987) para la articulación centrocárpica y 18 g/L (Steel, 2008) y 13,36 g/L (Albernaz *et al.*, 2013) para la articulación metacarpofalángica. Sin embargo, un valor menor a 20 g/L se considera normal para las articulaciones de los miembros (Steel, 2008). En relación a la cantidad de albúmina presente en el líquido sinovial equino, se ha descrito que bordea los 8,9 g/L (Greve *et al.*, 1987).

El componente celular del fluido sinovial es normalmente limitado y no suele sobrepasar los 500 células nucleadas por μ L (Steel, 2008), de los cuales los linfocitos u otras células mononucleares de origen medular representan la mayoría de la composición celular (van Weeren, 2014). La concentración de neutrófilos en una articulación sana no debería superar el 10% de las células nucleadas presentes, mientras que los eosinófilos apenas llegan al 1% (Steel, 2008).

Tecnologías para la búsqueda de proteínas de baja concentración.

En la búsqueda de proteínas que ayuden a entender mejor los mecanismos metabólicos y proporcionen opciones diagnósticas tempranas, se han desarrollado tecnologías que disminuyen las proteínas de alta abundancia (HAPs), que permiten dejar en evidencia aquella fracción proteica escasa o en baja concentración (LAPs). La aplicación de estas técnicas podrían dar una nueva visión en el desarrollo de patologías degenerativas articulares y ayudar en el diagnóstico temprano de éstas, por medio del descubrimiento de biomarcadores.

La problemática existente en el estudio de proteínas pequeñas y en baja concentración dentro del fluido sinovial, es que mediante el uso de los métodos convencionales de detección o aislamiento de éstas, no es posible visualizarlas, debido a que las proteínas de mayor abundancia, en este caso albúmina, intervienen en la interpretación de los resultados o en la detección de proteínas de baja abundancia (Boschetti y Righetti, 2008b).

Se estima que el suero humano contiene alrededor de 20 proteínas que representan el 99% de su concentración proteica, dejando un remanente del 1% para el resto de proteínas (Beseme *et al.*, 2010), en donde se encuentran una gran cantidad de tipos de proteínas que podrían jugar papeles metabólicos importantes, pero que por enmascaramiento no han sido detectadas o estudiadas suficientemente.

En el suero humano, se han realizado métodos de fraccionamiento cromatográfico o depleción por afinidad inmunológica, para la eliminación de estas proteínas de alta abundancia, pero desafortunadamente acarrean consigo algunas proteínas de baja abundancia (Thulasiraman *et al.*, 2005; Candiano *et al.*, 2009; Restuccia *et al.*, 2009).

Para el estudio más profundo del componente proteico de las células y sistemas es que se desarrolló la proteómica, que explora, a gran escala, la composición, cambios e interacciones de proteínas a nivel celular u orgánico, bajo ciertas condiciones o puntos en el tiempo (Fröhlich y Lindermayr, 2011). Sin embargo, existe la problemática en la búsqueda de la proteómica profunda, correspondiente a la fracción proteica de baja concentración, enmascarada por las proteínas de alta abundancia. Para esto, se ha desarrollado una tecnología llamada *combinatorial peptide ligand library* (CPLL) o bibliotecas de ligandos

combinatorias, que consiste en una fase sólida que cuenta con una gran cantidad de perlas de un polímero orgánico de hidroximetacrilato (Boschetti *et al.*, 2006), las cuales contienen múltiples copias de un mismo ligando específico (Boschetti y Righetti, 2008a).

Cada perla tiene millones de copias y cada una es potencialmente distinta de las demás, al considerar que para su síntesis se ocupan 20 tipos de aminoácidos naturales, lo que significa que la población total de hexapéptidos dentro de la biblioteca llega a 20^6 , o sea, 64 millones de combinaciones posibles (Righetti *et al.*, 2006) sin contar la incorporación de aminoácidos sintéticos. El polímero une a los hexapéptidos dentro de poros y mantiene la unión mediante un enlace covalente simple con el primer aminoácido (Righetti *et al.*, 2006; Boschetti y Righetti, 2013) (Fig. Nro. 2). Así, 1 mL de resina de puede contener 50 pmoles del mismo hexapéptido a lo largo de la superficie de la perla (Righetti *et al.*, 2006).

Al pasar la muestra a través la resina, los hexapéptidos se saturan con las proteínas del medio. Luego, la resina se somete a un flujo o lavado donde el exceso de proteínas que no encontraron el ligando se eliminará (Boschetti y Righetti, 2008a) (Figura Nro. 3). El tipo de unión entre las proteínas del medio y los péptidos ligando es de tipo inespecífica o de interacción débil, tales como: puentes de hidrógeno, electrostáticas y asociaciones hidrofóbicas (Boschetti y Righetti, 2013). Al tener todas las proteínas la misma probabilidad de unirse a los ligandos, y cuando las concentraciones de las proteínas de alta abundancia copan rápidamente sus sitios de unión respectivos, la diversidad del componente proteico se mantiene, pero varía en el hecho de que se equiparan las concentraciones entre HAPs y LAPs (Boschetti y Righetti, 2008a).

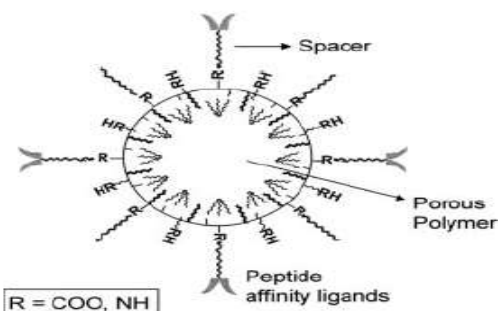


Figura Nro. 2. Esquema de la arquitectura de las perlas con sus respectivos ligandos (Boschetti *et al.*, 2006).

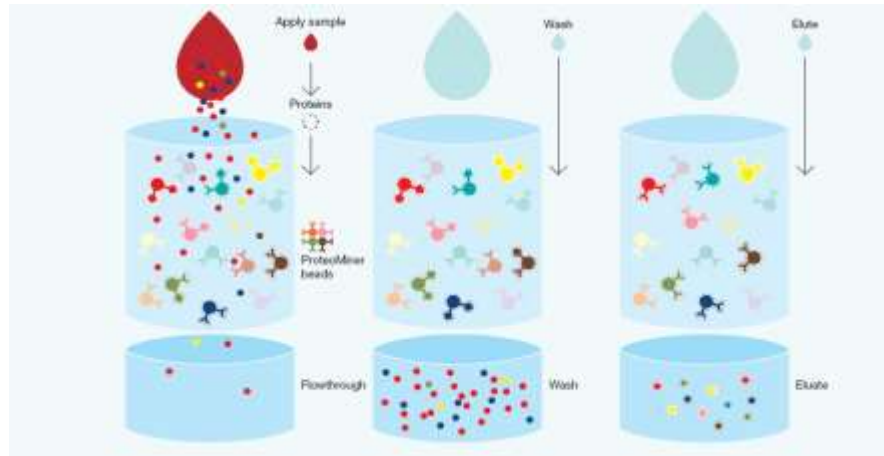


Figura Nro. 3. Esquema que ejemplifica el proceso de unión de la muestra con las perlas y el posterior proceso de lavado (BIO-RAD. sf)

OBJETIVO GENERAL

-Modificar el patrón electroforético del líquido sinovial equino y disminuir la intensidad de la banda de albúmina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Implementar un protocolo para la técnica de bibliotecas de ligandos combinatoriales, para permitir la disminución de proteínas de alta abundancia que interfieren en la visualización de proteínas menos abundantes electroforéticamente del líquido sinovial equino.

-Comparar cualitativamente del patrón electroforético de las proteínas del líquido sinovial equino con el solubilizado proteico posterior al tratamiento con bibliotecas de péptidos ligandos combinatoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica de dos equinos mestizos de matadero en condiciones de asepsia. La artrocentesis se llevó a cabo previa eliminación de la piel y desinfección de la zona con alcohol yodado. Posteriormente se puncionó los recessos sinoviales de la articulación metacarpofalángica, utilizando una jeringa de 5 ml con aguja 21 G para la obtención del fluido sinovial, el cual inmediatamente se colocó en un baño de hielo hasta su procesamiento posterior.

Finalmente, luego de realizada la artrocentesis de la articulación, se llevó a cabo una artrotomía y se clasificó como normal si macroscópicamente presentó un cartílago con su superficie lisa y brillante, de color blanco nacarado, sin líneas de roce o focos de erosión. Además, la membrana sinovial no debía estar congestiva y el líquido sinovial debía ser de color amarillo claro, transparente y sin signos de derrame sanguinolento (Adarmes *et al.*, 2003). Las muestras con presencia de alteraciones del cartílago o de la membrana sinovial u otros cambios inflamatorios en el tejido sinovial, ya sea por trauma agudo o crónico, fueron descartadas.

La determinación de la concentración proteica del fluido sinovial extraído se determinó mediante el método espectrofotométrico de Lowry *et al.* (1951), y se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) para establecer la curva estándar en un rango entre 0 y 80 mg. Todas aquellas muestras que presentaron una concentración proteica mayor a 15 mg/mL fueron descartadas.

Una vez procesada la muestra, se procedió a desarrollar el método de ecuilización proteica mediante el uso de bibliotecas de ligandos combinatoriales (Proteominer® *Bulk Beads* 163-3012).

El protocolo que se siguió fue una variación del procedimiento original estipulado por el fabricante para adaptarlo al trabajo con el líquido sinovial.

Protocolo de trabajo

Se resuspendieron 50 mg de *Bulk Beads* de Proteominer con 1 ml de etanol al 20% v/v en un tubo eppendorf, que se mantuvieron por 12 horas a temperatura ambiente, en rotación constante. Una vez reconstituida, se fraccionó en dos mitades de 500 μ l (25 mg de resina que representan aproximadamente 100 μ l resina)

Una fracción de la resina reconstituida se transfirió a un tubo estéril de 15 ml, el cual se centrifugó a 1.000 g por un minuto para trabajar con la fase sólida. Se eliminó el etanol y se agregó 1 mL de solución tampón de lavado formada por 50 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,4; para luego centrifugarlo a 1.000 g por un minuto, eliminándose el sobrenadante. Este proceso se repitió 3 veces.

Unión de muestra

Luego, a partir de un *pool* de líquido sinovial diluido 1:10 con agua desionizada, con un volumen final de 10 mL, se agregó 3,3 ml al tubo de 15 mL que contenía los 100 μ L de resina, y se dejó en rotación lenta, en un agitador, por dos horas a temperatura ambiente.

Lavado de muestra

Se centrifugó el tubo a 1.000 g por un minuto, para luego descartar el sobrenadante. Se añadió 1 mL de tampón de lavado, se rotó por 5 minutos para luego centrifugar a 1.000 g y descartar el sobrenadante. Este lavado se repitió 3 veces para asegurar la eliminación de proteínas en exceso del medio. Esta secuencia de unión y lavado de la muestra se repitió tres veces, completando el volumen final del *pool* de líquido sinovial con el fin de lograr la unión de proteínas que están menos representadas en el líquido sinovial.

Separación de las proteínas desde la resina

Finalizado el lavado, se añadió 1 mL de agua desionizada al tubo que contenía la resina con las proteínas, y se rotó por un minuto, y luego se centrifugó bajo las mismas condiciones previas. Se le añadió 1 mL de una solución de resuspensión (8M urea, 2% CHAPS) que se mantuvo por 15 minutos, agitando suavemente en vórtex en forma esporádica.

Finalmente se centrifugó a 1.000 g por 1 minuto quedando la fracción proteica en el sobrenadante. Este proceso se repitió tres veces para formar un *pool* con los sobrenadantes obtenidos, el que se fraccionó y almacenó a -20° C hasta su utilización.

A la fracción proteica obtenida se le determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry. Luego, el sobrenadante se sometió a una electroforesis unidimensional usando un sistema de formato mini 1-D de electroforesis (mini-PROTEAN®), en gel de poliacrilamida, en el que se incluyó líquido sinovial equino no tratado, para realizar la comparación y dilucidar el cambio del patrón electroforético.

Los componentes para la electroforesis fueron, por un lado el gel separador (8%) compuesto por: 2,7 mL acrilamida; 2,2 mL *buffer* gel (8,8 pH); 4,7 mL agua desionizada, 5 µL TEMED, 100 µL SDS 10% y 50 µL persulfato de amonio 10%. Por otro lado el gel concentrador (5%) compuesto por: 0,85 mL acrilamida; 1,25 mL *buffer* gel (6,8 pH); 2,85 mL agua desionizada, 5 µL TEMED, 50 µL SDS 10%, 25 µL de persulfato de amonio 10%. Por último la muestra de carga (4x) fue conformada por 200 µL de beta-mercaptoetanol por cada 600 µL de muestra.

De los diez espacios del gel electroforético, los primeros dos carriles quedaron sin ocupar. Los tres siguientes correspondieron a volúmenes decrecientes (15, 10 y 5 µL) de líquido sinovial equino tratado con bibliotecas de ligandos combinatoriales, mientras que desde el séptimo al noveno espacio se añadieron tres volúmenes decrecientes (15, 10 y 5 µL) de líquido sinovial equino sin tratar. Los carriles seis y diez corresponden a marcadores de peso molecular.

La electroforesis se corrió por 30 minutos a 50 V, para luego aumentar a 150 V por 1 hora. Luego de finalizada la electroforesis se dejó en un recipiente con azul de Coomassie R-250 por 24 horas.

En esta memoria de título se realizó una comparación cualitativa entre los patrones electroforéticos que se obtuvieron del líquido sinovial equino sin procesamiento versus los del solubilizado post-procesamiento con bibliotecas de ligandos combinatoriales.

RESULTADOS

Luego de realizado el protocolo para la disminución del rango dinámico proteico del líquido sinovial equino, se obtuvo un solubilizado final cuya concentración proteica fue 0,9 mg/ml. A partir de este solubilizado post-tratamiento resultante de protocolo de bibliotecas de ligandos combinatoriales, se efectuó una electroforesis monodimensional que se contrastó con el patrón electroforético del líquido sinovial equino sin tratar cuya concentración proteica fue de 8,5 mg/mL (Figura Nro. 4).

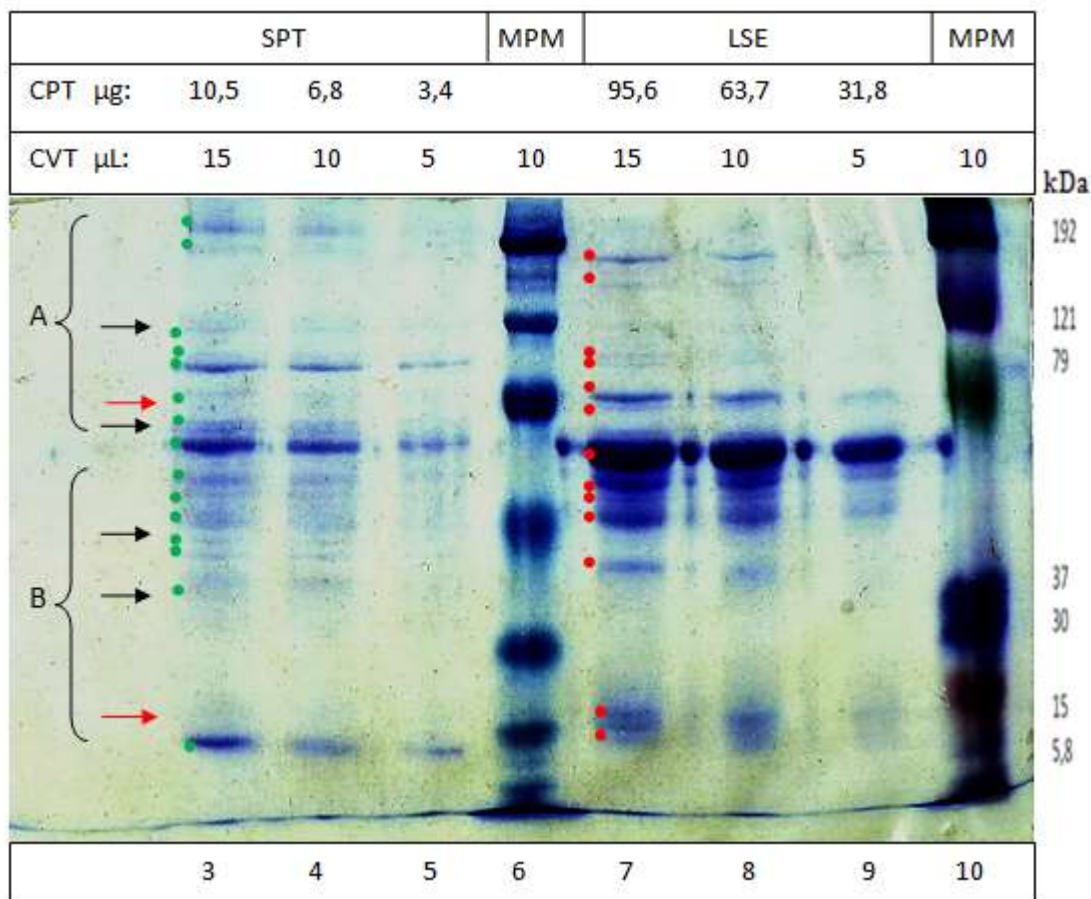


Figura Nro. 4. Electroforesis de líquido sinovial equino y solubilizados post tratamiento.

Los primeros carriles del gel fueron dejados en blanco. Los carriles tres cuatro y cinco, cuentan con cargas de volumen total (CVT) decrecientes del solubilizado post-tratamiento (SPT) (15, 10, 5 μL , respectivamente), indicándose sobre estos la carga proteica total (CPT). El sexto y décimo carril corresponde a un marcador de peso molecular (MPM). El carril siete, ocho y nueve corresponden a muestras de líquido sinovial equino (LSE) sin tratar en volúmenes decrecientes (15, 10, 5 μL respectivamente). Las flechas negras corresponden a las bandas adicionales, mientras que las rojas son aquellas que faltan respecto a la muestra sin tratar.

Se aprecia que en los carriles correspondientes al solubilizado proteico post-tratamiento hay una disminución significativa de la concentración relativa de albúmina, manifestándose en la disminución de la intensidad de la banda. Además, se distinguen siete bandas sobre la banda de albúmina entre, aproximadamente, los 70 kDa y 190 kDa (A), dos de las cuales no aparecen en la muestra original, versus las seis del líquido sin tratar. Por otro lado, hay un incremento en el número de bandas de proteína bajo la banda de albúmina, entre los 70 y 10 kDa aproximadamente (B), donde se aprecian siete bandas versus las seis del líquido sinovial no tratado, dando un total de quince bandas para el carril tres, versus las trece del carril siete. En conclusión, se estima que hay un aumento de 15,3 % en el total de bandas expresadas en el solubilizado proteico post-tratamiento. Por ende, se cumple con el objetivo de modificar el patrón electroforético del líquido sinovial equino, disminuyendo considerablemente la intensidad de la banda de albúmina y logrando la aparición de bandas que no son evidentes en el líquido sinovial sin tratar.

Sin embargo, en los rangos de peso molecular alrededor de los 10 kDa y 79 kDa, se aprecia la desaparición de dos bandas, que si se encuentran en el líquido sinovial no tratado, fenómeno que pudo deberse a una incapacidad de retención de la resina, o que tales péptidos o proteínas no pudieron ser removidas desde la resina mediante el protocolo de resuspensión realizado.

Debido al resultado obtenido el protocolo inicial se sometió a revisión para su optimización y así, se decidió incluir capturas a distinto pH y cambiar el método de resuspensión por uno que incluye SDS 10% y ditioneitol (DTT) 25 mM. Los resultados se muestran en la Figura Nro. 5.

Luego del cambio de protocolo hubo un notable incremento en la captura de proteínas totales en el solubilizado post-tratamiento (8,5; 6,2 y 5,2 mg/ml de proteína para pH 4,0; 7,0 y 9,3 respectivamente). Se efectúa una electroforesis con cargas de volumen total similares para evidenciar de forma gráfica el potencial de captura de proteínas a diferentes pH. El resultado se muestra en la Figura Nro. 5.

Se logró de aumentar la concentración de proteínas de baja abundancia del líquido sinovial tratado, que aparecían tenues en el gel electroforético del protocolo anterior. Por otro lado,

se logra la recuperación de las bandas faltantes en el gel electroforético del protocolo anterior, alrededor de los 15 kDa.

El número de bandas totales aumentó en comparación al gel anterior, donde dieciocho, dieciséis y trece bandas son apreciables para los pH 4,0; 7,0 y 9,3, respectivamente. En la Figura Nro. 5, en el carril para pH 4,0, se evidencia la aparición de tres bandas adicionales, en el rango de los 70 y los 40 kDa, en relación al gel anterior. El número de bandas sobre la albúmina se mantuvo, aunque la distribución de ellas entre el rango de los 70 y 120 kDa es diferente.

Otro de los fenómenos observables, haciendo una comparación entre los gels de las Figuras Nro. 4 y 5 es que bandas que se encontraban tenues en el carril del líquido sinovial sin tratar aumentaron su intensidad en los carriles correspondientes a muestras tratadas, que sin embargo, vuelven a atenuarse en el gel de la Figura Nro. 5, donde las muestras se sometieron a un cambio en las condiciones de captura. Ejemplo de ello es la cuarta banda (de arriba a abajo) del carril siete de la Figura Nro. 4, que por peso molecular correspondería a la quinta banda del carril tres, alrededor de los 100 kDa aproximadamente, la que posteriormente el gel de la Figura Nro. 5 aparece en los carriles dos, tres y cuatro en la cuarta posición.

Para evidenciar la expresión diferencial de bandas en el gel electroforético entre el solubilizado post-tratamiento y una muestra control de líquido sinovial equino sin tratar, se corrieron alícuotas que contuvieran la misma concentración total de proteína. El resultado se muestra en la Figura Nro. 6.

El total de bandas contabilizadas en la muestra control fue de 13 (al igual que el gel de la Figura Nro. 5), mientras que las bandas para los solubilizados post-tratamiento de pH 4,0; 7,0 y 9,3 fueron de once, once y quince, respectivamente. Si bien en los carriles correspondientes a pH 7,0 y 9,3 se obtuvo una menor cantidad de bandas que la muestra control, fue posible evidenciar una banda bajo la albúmina, entre los 60 y 70 kDa aproximadamente (cabeza de flecha), quizás enmascarada en la muestra control. Esto es aún más evidente en el quinto carril, donde se evidencia otra banda adicional (doble cabeza de flecha), bajo la banda de albúmina y sobre la banda adicional antes descrita. Puesto que ya se había evidenciado con anterioridad bandas adicionales bajo la albumina en el gel de la

Figura Nro. 5, para la elaboración del gel de la Figura Nro. 6 se incorporó al primer carril, una proteína pura que tuviera un peso molecular levemente menor a la albúmina pero que existiera dentro del rango que abarca la gran banda de albúmina en el líquido sinovial sin tratamiento. Calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi* fue la elegida debido a que, en geles SDS corre entre los 60 y 63 kDa (Michalak *et al.*, 1992).

Las bandas antes descritas parecen migrar junto a la calreticulina, por lo que se infiere que podrían tener un peso molecular semejante, y por ende, corresponderían a proteínas enmascaradas por la banda de albúmina.

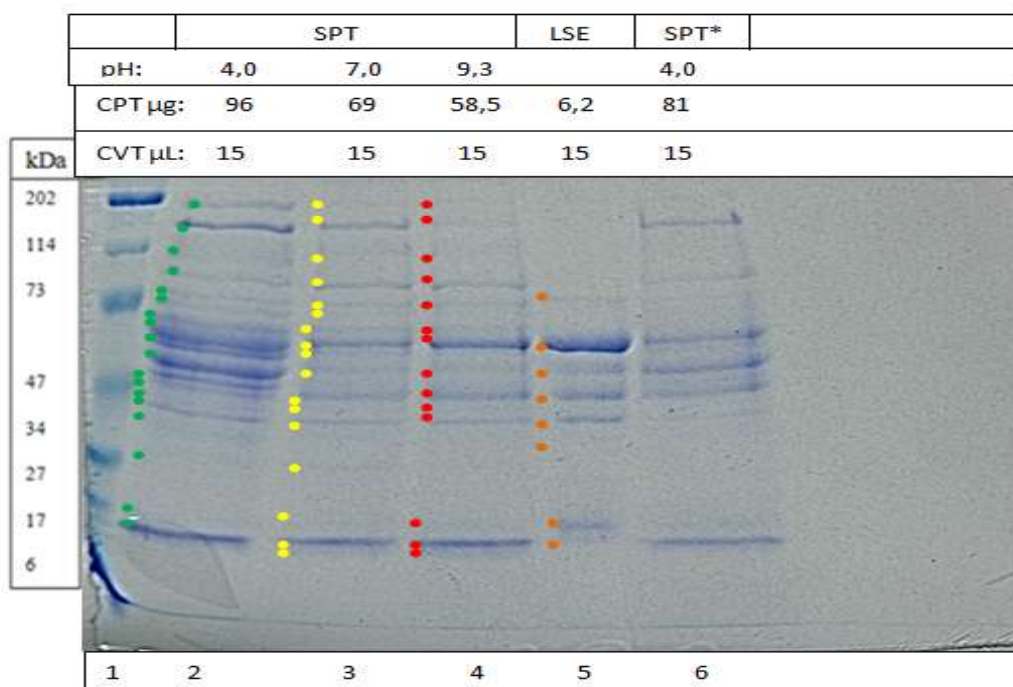


Figura Nro. 5. Electroforesis de líquido sinovial equino que incluye las variaciones al protocolo inicial, con capturas a pH extremos y diferente solución de resuspensión. Comparación a volúmenes iguales.

El primer carril corresponde a un estándar de peso molecular. Del carril dos al cuatro, corresponden a cargas de 15 μ L (CVT) de líquido sinovial equino tratado con Proteomimer a diferentes pH (4,0; 7,0 y 9,3 para los carriles dos, tres y cuatro, respectivamente). El quinto carril corresponde a una carga de líquido sinovial sin tratar, en dilución 1:10. En cada carril se especifica la carga de proteína total (CPT). El sexto carril corresponde a solubilizado post-tratamiento (SPT*) de líquido sinovial equino que fue tamponado a pH 4,0 previo a la filtración.

En cuanto al cambio de patrón electroforético a distintos pH, es evidente que hay una mayor cantidad de bandas, y de mayor definición, en el carril correspondiente a pH 4,0. Ejemplo de ello es la segunda banda del carril cinco, que corresponde a la primera banda aparente de los carriles tres y cuatro, donde a medida que el pH se alcaliniza, la banda se hace menos definida. Otro ejemplo es una de las bandas (punta de flecha) que aparece bajo la albúmina, que aparece muy intensa a pH 4,0 pero se expresa de forma tenue en los otros carriles con diferente pH. Por ende, se puede evidenciar que existe la expresión diferencial de proteínas entre los solubilizados post-tratamiento de los distintos pH.

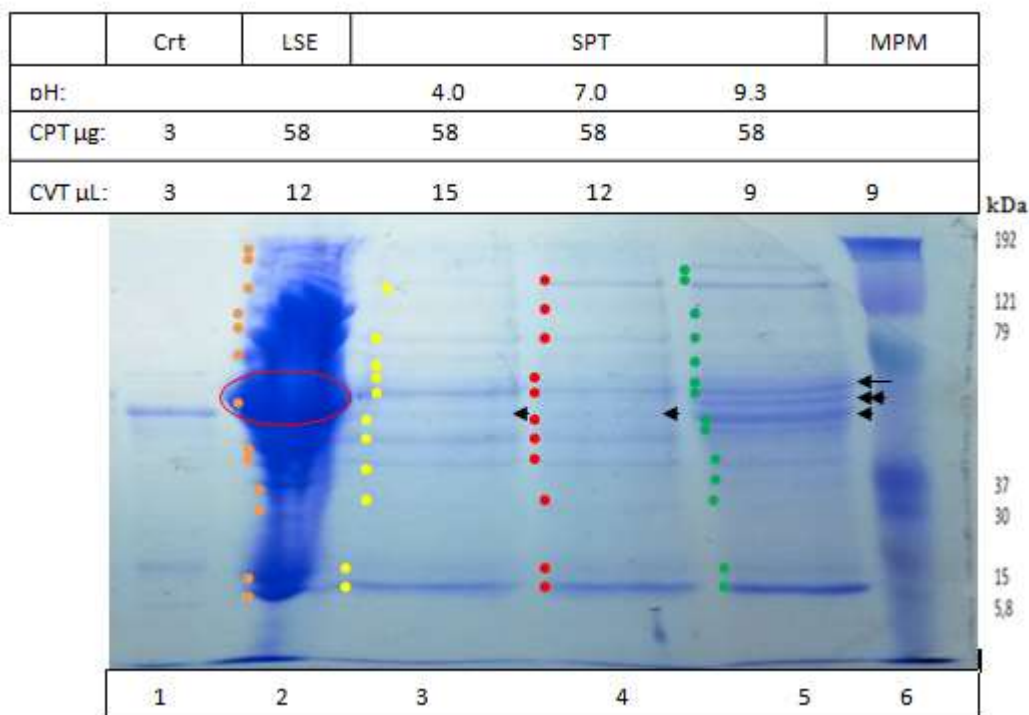


Figura Nro. 6. Electroforesis de líquido sinovial equino que incluye las variaciones al protocolo inicial, con capturas a pH extremos y diferente solución de resuspensión. Comparación a concentraciones proteicas similares.

El primer carril de la imagen corresponde a una alícuota de Calreticulina (Crt) recombinante de *Trypanosoma cruzi*. El segundo carril corresponde a la carga de líquido sinovial (LSE) sin diluir, en una concentración de 6,6 mg/ mL. Del tercer al quinto carril corresponde a líquidos sinoviales tratados con Proteominer, a diferentes pH (4,0; 7,0 y 9,3 respectivamente). El último carril corresponde a un marcador de peso molecular (MPM). El círculo rojo corresponde a la gran banda de albúmina del líquido sinovial sin tratar. La flecha corresponde a la banda de albúmina en las muestras tratadas con Proteominer. Las cabezas de flecha corresponden a bandas ubicadas bajo la albúmina. CVT: Carga de volumen total. CPT: Carga de proteína total.

DISCUSIÓN

En base al protocolo propuesto originalmente, en el gel electroforético se obtuvo una disminución de las proteínas de alta abundancia en el líquido sinovial y un incremento de aquellas que están en menor concentración, expresado en el gel electroforético. A pesar de la aparición de nuevas bandas (cuatro) en el patrón electroforético y la disminución de la intensidad de proteínas de alta abundancia, como la albúmina, la recuperación de proteínas totales fue ínfima (0,9 mg/ml) en relación al potencial que representa la tecnología de péptidos ligandos combinatoriales

La poca cantidad de proteína recuperada correspondiente a un 11,25% del total cargado en base a este protocolo, podría deberse a dos factores determinantes en el uso de la tecnología de los péptidos ligandos combinatoriales. El primero, es que las condiciones del medio de captura a las que se sometió esta resina, no permitieron la captura de las especies proteicas. Segundo, es que la solución de resuspensión de las proteínas capturadas por la resina solo permitió una separación parcial de ellas. La sumatoria de ambos factores podrían explicar la baja cantidad de proteínas recuperadas por medio del protocolo propuesto originalmente.

Sin embargo, en este resultado también podría haber influido la baja cantidad total de proteína utilizada (8 mg totales) que se obtuvo a partir de dos muestras de líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica, con una concentración de 8mg/ mL. En este caso, considerando la alta relación volumen de resina/ volumen de muestra (1:100), debería haber sido considerablemente mayor la visualización de nuevas bandas proteicas según lo descrito por Thulasiraman *et al.*, (2005), en cuanto a las condiciones de sobrecarga u *overloading*.

Entre las condiciones del medio que podrían condicionar la captura de proteínas se encontrarían la fuerza iónica y el pH. El *buffer* fosfato salino (PBS) utilizado como solución de lavado para la interacción resina - proteína puede afectar la forma de interacción entre los hexapéptidos de la resina y las proteínas del medio interfiriendo en la cantidad y tipo de proteína capturada por la resina. Di Girolamo *et al.* (2011) hace una acotación importante en este punto, indicando que la adición de NaCl en una concentración 150 mM interfiere notablemente en la captura de proteína, la que disminuiría hasta tres veces, debido a que los iones forman interacciones electroestáticas con los hexapéptidos de

la resina, interviniendo los sitios de unión. Gurrier *et al.* (2006), también da cuenta de este fenómeno, donde comparó la recuperación de proteína trabajando con PBS con y sin la adición de sal, obteniendo 12 y 19 mg de proteína, respectivamente. Sin embargo, se documenta que hay proteínas que exclusivamente se sobreexpresan bajo condiciones de alta salinidad (Boschetti y Righetti, 2013). Esto se hace evidente cuando se comparan los geles de la Figura Nro. 4 y 5, donde luego de ser removido el NaCl del *buffer* de lavado, las bandas que aparecen intensas en los carriles correspondientes al protocolo original se atenúan al modificar las condiciones de captura, pudiéndose inferir que éstas son proteínas que facilitan su captura bajo altas concentraciones de sal.

En suero humano, existe evidencia de que en condiciones de captura a pH 7,4 hay bandas de proteínas que dejan de aparecer en muestras tratadas con CPLL en relación a las no tratadas (Fasoli *et al.*, 2010) y se estima una pérdida de entre un 10-15% de proteínas (Righetti *et al.*, 2010), y posiblemente muchas serían de interés para el completo estudio del proteoma de diversos fluidos. Para minimizar las pérdidas, se teoriza que la modificación del pH del medio podría variar la forma de interacción entre los hexapéptidos y las proteínas, mediante la protonación (o desprotonación) de los grupos amino y carboxilo de cada aminoácido que conforman tanto los hexapéptidos de la resina como las proteínas a capturar (Boschetti y Righetti, 2013), confiriendo un cambio en las constantes de afinidad para aquellas proteínas con bajo poder de captura a pH fisiológico. En relación a las condiciones de interacción, se ha visto que el pH es determinante tanto en el comportamiento de la resina como de las proteínas del medio, condicionando la forma en que los péptidos interactúan con las proteínas (Restuccia *et al.*, 2009; Fasoli *et al.*, 2010; Boschetti y Righetti, 2013). Fasoli *et al.* (2010) demostraron experimentalmente el impacto del pH ambiental en la forma de interacción entre la resina y las proteínas del medio, mediante el cambio de las condiciones de captura, variando el pH del medio mediante *buffer* de pH extremos; 4,0; 7,2 y 9,3. Así, se determinó un aumento de un 65% en la capacidad de captura de especies proteicas, donde solo un 12% eran proteínas comunes a los tres pH.

Otro punto crítico del protocolo es la solución de resuspensión de proteínas desde la resina, debido a que la solución utilizada (8M Urea, 2% CHAPS) rompe las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, formadas entre las proteínas y los hexapéptidos. La

urea, si bien se encuentra en una concentración molar altamente desnaturalizante, sólo interviene en la disolución de enlaces de puentes de hidrógeno, mecanismo secundario de unión entre la resina y proteínas (Boschetti y Righetti, 2013). Por otro lado, el detergente CHAPS, interviene rompiendo las interacciones hidrofóbicas, que si bien conforman una parte importante del proceso de unión, no es la principal. Esto determina que con el protocolo de resuspensión utilizado en el primer ensayo se recupere una fracción minoritaria de las proteínas capturadas. Se ha determinado la eficiencia de recuperación de las proteínas desde la resina utilizando diferentes soluciones de resuspensión usadas para el estudio del proteoma de varios fluidos biológicos. Así se estableció que soluciones como TUC (8M urea, 2M tiourea y 3% CHAPS) y UCA (9M urea, pH 3.5 con ácido cítrico, 2% CHAPS) tienen un potencial de solubilización de aproximadamente un 45% cada uno (Di Girolamo *et al.*, 2011), y hasta un 70-90% en caso de solubilización secuencial (Candiano *et al.*, 2009; Di Girolamo *et al.*, 2011), incluso teniendo ésta última solución la capacidad de romper asociaciones iónicas.

Tomando la evidencia anterior es que se plantea la incursión en un nuevo protocolo, que considere las condiciones de *overloading*, aumentando el volumen de muestra a tratar, la disminución de la fuerza iónica del medio, cambio de condiciones de interacción mediante modificación del pH del medio variando la composición de los *buffers*, y la modificación de la solución de resuspensión, para optimizar la recuperación de especies proteicas.

Así, se tomaron diez muestras de líquido sinovial equino de la articulación metacarpofalángica de diez ejemplares, bajo las mismas condiciones anteriores, obteniéndose aproximadamente 23 mL. Se les determinó la cantidad de proteína mediante el método de Lowry y se procedió a conformar un *pool*, de 5,5 mg/ml de proteína, el cual fue sometido a una filtración en vacío (600 mm Hg) a través de una membrana de celulosa (Millipore) de 0,22 μm , para remover de forma mecánica el ácido hialurónico, que debido a que le confiere propiedades viscoelásticas al líquido sinovial, podría interferir con la unión de las proteínas con la resina (Righetti y Boschetti, 2015). Además, por su condición de anión, podría formar asociaciones electrostáticas que interfieran con los sitios de unión de los hexapéptidos. El volumen recuperado, luego de la filtración, fue de 20 mL.

Se determinó, mediante el método de Lowry, que la filtración no modificó el contenido proteico, pero si disminuyó considerablemente la viscosidad del líquido. Esto último se evaluó midiendo la velocidad que toma una esfera metálica de 0,44 mg en su paso por un tubo de vidrio de 10 cm, con una inclinación de 10°, que a medida que el medio es más viscoso, más resistencia representa para el paso de la esfera. Se teoriza que las hebras de ácido hialurónico quedaron retenidas en la filtración y eso disminuyó la viscosidad del líquido.

Paralelamente se elaboraron tres *buffers* con distintos pH y con una baja concentración molar, para no aumentar la fuerza iónica. Las soluciones tampón fueron: *buffer* acetato 25mM pH 4,0; *buffer* fosfato 25mM pH 7,0; *buffer* Tris-HCl 25mM pH 9,3; a las cuales no se les añadió los 50 mM de NaCl del protocolo anterior.

Posteriormente, el *pool* ya filtrado es separado en tres alícuotas de 6,5 mL, y cada una se tampona con 13,5 ml de *buffer* diferentes, para evaluar la captura de proteínas a pH distintos. El resultado son tres tubos de 20 mL cada uno, tamponados con tres pH distintos.

Por otro lado, se resuspenden 100 mg de *Bulk beads* de Proteominer, y se fraccionaron en 3 alícuotas de 100 µL en 3 tubos de 15 mL, cada uno tamponado con 100 µL de un *buffer* distinto.

El resultado final es un aumento de la relación volumen de resina /volumen de muestra de 1:100 correspondiente al protocolo anterior, con una carga de proteína de 8 mg totales, a una relación de 1:200 con un carga de 36,6 mg totales aproximadamente.

A cada tubo con resina se le añadió 5 mL de líquido sinovial filtrado y tamponado respectivo, y se procedió a rotarlos en un agitador por 2 horas. Luego de cumplido el tiempo, se centrifugó a 1.000 g por 1 minuto, se eliminó el sobrenadante, y se lavó con 1 mL *buffer* respectivo y 1 mL de agua desionizada. Este proceso se llevó a cabo cuatro veces hasta completar los 20 mL de cada alícuota.

Luego de completado el proceso de unión de muestra, los 100 µL de resina saturada se resuspendieron con 500 µL de una solución SDS 10% 50mM DTT en un hervor por 10 minutos, para luego centrifugarse a 1.000 g por 5 minutos (Boschetti y Righetti, 2013; Righetti y Boschetti, 2015). Posteriormente, se tomó el sobrenadante de los tres tubos y se transfieren a tres tubos eppendorf. La resuspensión se repitió una vez más, con 500 µL de la

solución para garantizar la recuperación completa de las proteínas capturadas. Una vez terminada la resuspensión, se almacenó a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Se determinó el contenido de proteína de cada alícuota, tratadas a distintos pH, mediante el método de Lowry. Los resultados para cada pH fueron: 8,5 mg/mL (pH 4,0); 6,2 mg/mL (pH 7,0) y 5,2 mg/mL (pH 9,3). En relación al total de proteína cargada en cada tubo (30 mg cada uno), la recuperación de proteína alcanzó hasta un 23,22%, solo considerando la recuperación de proteína a pH 4,0. En relación al protocolo original, donde la recuperación de proteína correspondió a 0,9 mg/mL de un total de 8 mg de carga total (11,25%). Con el nuevo protocolo, se estima que la cantidad de proteína recuperada aumentó en hasta un 944%, comparando la recuperación de proteína del protocolo original con la recuperación a pH 4,0.

En relación a la electroforesis realizada para el nuevo protocolo y evaluar la capacidad de captura a diferentes pH, cuyo resultado se aprecia en la Figura Nro. 5, se cargaron alícuotas de 15 μL , tanto de líquido sinovial equino sin tratar en dilución 1:10 como de líquido sinovial tratado con CPLL. Las cargas de proteína fueron de 96 μg para el carril correspondiente al tratamiento con pH 4,0; 69 μg para el pH 7,0 y 58 μg para el pH 9,3, mientras que para el líquido sinovial sin tratar se cargó un total de 8,25 μg . Tal diferencia de carga está en función de la comparación de las bandas de albúmina, para apreciar tamaños e intensidades similares y evidenciar el fenómeno de expresión de bandas de mediana o baja presencia en el líquido sinovial tratado con CPLL.

A modo de comparación, se incluyó una alícuota de 15 μL de líquido sinovial tratado a un pH 4,0 en el sexto carril, que fue filtrado posteriormente al tamponamiento. El proceso fue engorroso debido a la precipitación de proteína, que formó una especie de espuma que dificultó la filtración. Además, mediante el método de Lowry, se determinó que la recuperación de proteína fue menor en relación a la filtración previa al tamponamiento (7,2 mg/mL).

En el gel electroforético de la Figura Nro. 5, se apreció una notable diferencia en la aparición de bandas en las muestras tratadas a diferentes pH (dieciocho, diecisiete y catorce bandas apreciables, para los pH 4,0; 7,0 y 9,3 respectivamente) en relación a la muestra original de la Figura Nro. 4 (trece bandas apreciables), estimándose un aumento en la

expresión de bandas de 38,5 % para el pH 4,0 y 23,1% para pH 7,0; mientras que para pH 9,3 solo un 7,7%. Otro fenómeno observado es la aparición diferencial de bandas en carriles tratados a diferentes pH, cumpliéndose con lo estipulado con anterioridad, donde el pH del entorno modula la interacción entre las proteínas del medio con los hexapéptidos.

En relación a la comparación de los geles resultantes de los diferentes protocolos utilizados, si bien existen diferencias en el número de bandas y en la intensidad de éstas, la diferencia de la concentración del total de proteína recuperada con ambos protocolos no es apreciable en la magnitud que debiera en el gel electroforético, considerando la gran diferencia entre los 0,9 mg/ mL del protocolo inicial, versus los 8,5 mg/ mL recuperados en pH ácido, quizás debido a la sensibilidad de la tinción aplicada.

Es evidente también la aparición de una banda entre los 60 y 70 kDa en los carriles de pH 7,0 y pH 4,0; bajo la banda de albúmina, que no es apreciable en las muestras tratadas con el protocolo anterior, como la muestra sin tratar, demostrando lo estipulado con anterioridad sobre la posibilidad de que la gruesa banda de albúmina del patrón electroforético del líquido sinovial equino pudiera enmascarar u obstaculizar la visualización de proteínas dentro del mismo rango de peso molecular. Tal fenómeno también es apreciable en la Figura Nro. 6, donde se pretendió comparar los patrones electroforéticos resultantes del tratamiento de líquido sinovial equino con CPLL a diferentes pH y una muestra control de líquido sinovial sin tratar, todas con concentraciones proteicas similares. En éste gel es apreciable que en el penúltimo carril, correspondiente a líquido sinovial tratado a pH 4,0; es apreciable una banda bajo la albúmina que no se encuentra ni en el patrón de la muestra control ni en las muestras tratadas a pH 7,0 y 9,3. Con el fin de estimar el peso aproximado de tal banda es que se incorpora al gel una alícuota en el primer carril, de calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi*, cuyo peso oscila entre los 60 y 63 kDa en geles SDS (Michalak *et al.*, 1992). Pareciera ser que la banda bajo la albúmina en muestras tratadas con CPLL a pH 4,0 migra en conjunto con la calreticulina, pudiéndose inferir que posee un peso semejante y que gracias a esta técnica pueden ser visualizadas bandas proteicas en el gel electroforético con rangos de pesos moleculares semejantes a la albúmina, sin ser enmascaradas por ésta u obstaculizadas por las limitantes relativas a las proteínas de baja abundancia.

La aplicación de bibliotecas de ligandos combinatoriales en el líquido sinovial equino ha demostrado ser de utilidad, no solo cumpliendo el objetivo de disminuir el tamaño e intensidad de la banda de albúmina en el gel electroforético, sino que, además, permite la visualización de bandas adicionales que eran imposibles de apreciar en el gel debido al efecto de enmascaramiento producido por la albúmina o a su baja concentración. Es así, como esta tecnología se posiciona como un método de gran utilidad en el estudio del componente proteico del líquido sinovial equino, permitiendo apreciar proteínas indetectables con otras metodologías, que pudieran tener importancia no solo para el estudio del metabolismo articular, sino que también, como herramienta diagnóstica o arista terapéutica para afecciones sinoviales.

A modo de prospección de este estudio, es necesario entender que bajo las condiciones de captura utilizadas se logra una captura extensa del contenido proteico del líquido sinovial, pero no es completa. La recuperación de proteínas y su expresión en el gel electroforético están limitadas por ciertas características del método aplicado. Los volúmenes de muestra manejables con este método no consideran columnas dentro de la captura, siendo reemplazadas por tubos de 15 mL, limitando así el volumen de muestra total que entra en contacto con la resina.

Otra limitante es que el método de captura considera condiciones de baja fuerza iónica del medio, excluyendo tipos de proteínas que solamente se expresan durante medios con alta fuerza iónica. Santucci *et al.* (2013), además de incluir la captura a tres pH distintos, incorporan medios de captura en bajas y altas concentraciones molares de sales, modificando la fuerza iónica del medio. Encontraron que esta metodología, que incorpora una nueva dimensión de captura, permite reducir las pérdidas de proteínas.

El método de tinción utilizado también se incorpora como limitante, ya que debido a la baja sensibilidad del azul de Coomassie, la cantidad de bandas apreciables en el gel de acrilamida es baja. Sin embargo, para efectos de este estudio, que tenía como objetivo la modificación del patrón electroforético del líquido sinovial equino, la tinción cumple con su cometido.

A futuro, para el estudio más exhaustivo del líquido sinovial equino es necesario incorporar al protocolo estas variantes, que permitan optimizar en un mayor grado la obtención de

CONCLUSIONES

1) Mediante la tecnología de péptidos ligandos combinatoriales (CPLL) se consigue un cambio en el patrón electroforético del líquido sinovial equino y una notable disminución en la presencia de la banda de albúmina.

2) La modificación del protocolo inicial permite una mayor recuperación de proteína total en el solubilizado post-tratamiento y al mismo tiempo una mejor definición de las bandas en el gel electroforético.

3) La utilización de distintos pH durante la fase de captura permite obtener una diferente distribución de bandas de proteína en el patrón del gel electroforético.

BIBLIOGRAFÍA

- **ADARMES, H.; RIVEROS, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZALEZ, E.** 2003. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. Archivos de Medicina Veterinaria. 35: 53-59.
- **ALBERNAZ, R.; BASILE, R.; FERRAZ, G.; CARVALHO, M.; ARAÚJO, R.; FAGLIARI, J.; QUEIROZ-NETO, A.** 2013. Physiological concentrations of acute-phase proteins and immunoglobulins in equine synovial fluid. Elsevier. Journal of Equine Veterinary Science. 33: 201-204.
- **ARAYA, O.; CHÁVEZA, H.; FOLCH, H.; MORÁN, G.** 2010. Uso de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedad articular en el caballo. Archivos de Medicina Veterinaria. 42: 1-10.
- **BESEME, O.; FERTIN, M.; DROBECQ, H.; AMOUYEL, P.; PINET, F.** 2010. Combinatorial peptide ligand library plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. Electrophoresis. 31: 2697-2704.
- **BIO-RAD.** sf. ProteoMiner™ Protein Enrichment Technology. California, USA.
- **BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.; LOMAS, L.; CITTERIO, A.** 2006. Protein Equalizer™ Technology: The quest for a “democratic proteome”. Proteomics. 6: 3980–3992.
- **BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.** 2008a. Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. BioTechniques. 4: 663-665.
- **BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.** 2008b. The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species. Journal of Proteomics. 71: 255-264.

- **BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.** 2013. Low-abundance proteome discovery: state of the art and protocols. W.B Saunders. Elsevier. pp 490.

- **CANDIANO, G.; DIMUCCIO, V.; BRUSCHI, M.; SANTUCCI, L.; GUSMANO, R.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.; GHIGGERI, G.** 2009. Combinatorial peptide ligand libraries for urine proteome analysis: Investigation of different elution systems. *Electrophoresis*. 30: 2405–2411.

- **CRISMAN, M.; SCARRATT, W.; ZIMMERMAN, K.** 2008. Blood proteins and inflammation in the horse. *Veterinary Clinic Equine*. 24: 285–297.

- **DENTON, J.** 2012. Synovial fluid analysis in the diagnosis of joint disease. *Diagnostic Histopathology*.18: 159–168.

- **DI GIROLAMO, F.; BOSCHETTI, E.; CHUNG, M.; GUADAGNI, F.; RIGHETTI, P.** 2011. “Proteomineering” or not? The debate on biomarker discovery in sera continues. *Journal of Proteomics*.74: 589 –594.

- **FASOLI, E.; FARINAZZO, A.; SUNB, C.; KRAVCHUKA, A.; GUERRIER, L.; FORTISC, F.; BOSCHETTIC, E.; RIGHETTI, P.** 2010. Interaction among proteins and peptide libraries in proteome analysis: pH involvement for a larger capture of species. *Journal of Proteomics*. 73: 733 –742.

- **FRISBIE, D.** 2012. Synovial Joint Biology and Pathobiology. **In:** Auer, J; Stick, J. (Eds).*Equine Surgery*. Cuarta edición. W.B. Saunders. St. Louis, Missouri. USA. pp 1096-1114.

- **FRÖHLICH, A.; LINDERMAYR, C.** 2011. Deep insights into the plant proteome by pretreatment with combinatorial hexapeptide ligand libraries. *Journal of Proteomics*. 74: 1182 –1189.

- **GREVE, E.; WITTWER, F.; WEGMANN, E; BÖHMWALD, H.** 1987. Características del líquido sinovial del carpo de equinos mestizos chilenos de silla. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2: 88-93.

- **GUERRIER, L.; THULASIRAMAN, V.; CASTAGNA, A.; FORTIS, F.; LIN, S.; LOMAS, L.; RIGHETTI, P.; BOSCHETTI, E.** 2006. Reducing protein concentration range of biological samples using solid-phase ligand libraries. *Journal of Chromatography B*. 833: 33–40.

- **LOWRY, O.; ROSEMBOURH, N.; RANDALL, R.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

- **MAHAFFEY, E.** 2002. Synovial Fluid. **In:** Cowell R.; Tyler, R. (Eds). *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. Segunda edición. Mosby, Inc. St. Louis, Missouri. USA. pp 163-169.

- **MICHALAK, M.; MILNER, R.; BURNS, K.; OPAS, M.** 1992. Calreticulin. *Biochemical Journal*. 285: 681-692.

- **RESTUCCIA, U.; BOSCHETTI, E.; FASOLI, E.; FORTIS, F.; GUERRIER, L.; BACHI, A.; KRAVCHUK, A.; RIGHETTI, P.; BOSCHETTI, E.** 2009. pI-based fractionation of serum proteomes versus anion exchange after enhancement of low-abundance proteins by means of peptide libraries. *Journal of Proteomics*.72: 1061–1070.

- **RIGHETTI, P.; BOSCHETTI, E.; LOMAS, L.; CITTERIO, A.** 2006. Protein Equalizer™ Technology: The quest for a “democratic proteome”. *Proteomics*. 6: 3980–3992.

- **RIGHETTI, P.; BOSCHETTI, E.; ZANELLA, A.; FASOLI, E.; CITTERIO, A.** 2010. Plucking, pillaging and plundering proteomes with combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Chromatography A*. 1217: 893–900.

- **RIGHETTI, P.; BOSCHETTI, E.** 2015. Sample Treatment Methods Involving Combinatorial Peptide Ligand Libraries for Improved Proteomes Analyses. **In:** Vlahou, A.; Makridakis, M. (Eds.). *Clinical Proteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Segunda edición. Humana Press. 1243. pp 55-82.

- **SANTUCCI, L.; CANDIANO, G.; ANDREA PETRETTO, A.; LAVARELLO, C.; BRUSCHI, M.; GHIGGERI, G.; CITTERIO, A.; C, RIGHETTI, P.** 2013. Combinatorial ligand libraries as a two-dimensional method for proteome analysis. *Journal of Chromatography A*. 1297: 106– 112

- **STEEL, C.** 2008. Equine synovial fluid analysis. *Veterinary Clinic Equine*. 24: 437-454.

- **THULASIRAMAN, V.; BOSCHETTI, E.; LIN, S.; GHEORGHIU, L.; LATHROP, J.; LOMAS, L.; HAMMOND, D.** 2005. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis*. 26: 3561–3571.

- **TODHUNTER, R.** 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. **In:** Frisbie, D.; Mcilwraith, D.; Trotter, G. (Eds). *Joint Disease In The Horse*. W.B. Saunders. Philadelphia. USA. pp 490.

- **VAN WEEREN, R.** 2014. Joint physiology: responses to exercise and training. **In:** Hinchcliff, K; Kaneps, A.; Geor, R. (Eds) *Equine Sports Medicine and Surgery*. Segunda Edición. W.B. Saunders. St. Louis, Missouri. USA. pp 213-222.