



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



**“EFECTO ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO HIALURÓNICO, CONDROITÍN
SULFATO Y LÍQUIDO SINOVIOL DE ARTICULACIÓN METACARPO
FALÁNGICA EQUINA NORMAL, CON DAÑO CRÓNICO Y CON MEMBRANA
SINOVIOL CONGESTIVA”**

Andrea Julieta Müller Sepúlveda

Memoria para optar al título profesional de
Médico Veterinario.

Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

Profesor Guía: Dr. Héctor Adarmes Ahumada

Financiamiento: Proyecto FIV 2007

Nº 12100101 4602018

SANTIAGO – CHILE

2008

AGRADECIMIENTOS

En la elaboración de esta memoria de título, he tenido la oportunidad de trabajar con muchas personas que han ayudado a la culminación de este proyecto, a todas ellas quiero expresar mi sinceros agradecimientos.

Quiero agradecer a mi profesor guía doctor Héctor Adarmes, por brindarme la oportunidad de realizar mi memoria y por su constante enseñanza y apoyo. Entrego mi agradecimiento a la profesora María Eugenia Letelier, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y a todo su equipo de laboratorio, por la acogida y continuo apoyo entregado en el desarrollo de esta memoria. Además agradezco al profesor Marco Galleguillos por sus observaciones y colaboración.

También quiero expresar mis agradecimientos a todos mis compañeros de Medicina Veterinaria por su constante amistad, entregándome ánimo para lograr terminar esta memoria. Gracias a todos mis amigos quienes me han apoyado incondicionalmente.

Y finalmente quiero expresar mis agradecimientos a mis padres y a mi familia por estar siempre cerca, apoyándome durante toda la carrera, dándome ánimo y consuelo cuando más lo necesitaba.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE GENERAL.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	43
ABREVIATURAS.....	44
REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Fotografía corte sagital de la articulación metacarpo falángica equina.	Pág. 10
Figura 2	Esquema del Agregán.	Pág. 12
Figura 3	Esquema de la Matriz Extracelular.	Pág. 12
Figura 4	Condroitín-6-sulfato.	Pág. 12
Figura 5	Acido Hialurónico.	Pág. 13
Figura 6	Cascada bioquímica del proceso inflamatorio articular.	Pág. 14
Figura 7	Actividad de enzimas antioxidantes.	Pág. 17
Figura 8	Fotografías de diferentes condiciones de la articulación metacarpo falángica equina.	Pág. 21
Figura 9	Reacción de condensación de Acido Tiobarbitúrico y Malondialdehído.	Pág. 23

Figura 10	Conjugación de Glutación (GSH) con 1-cloro-2,4-DNB.	Pág. 25
Figura 11	Reacción de tioles con DTNB.	Pág. 26
Figura 12	Efecto de Líquido Sinovial sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.	Pág. 29
Figura 13	Figura 13: Efecto de Acido Hialurónico y Condroitín-Sulfato sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.	Pág. 31
Figura 14	Actividad GSH-T microsómica y en los Líquidos Sinoviales.	Pág. 33
Figura 15	Efecto de los Líquidos Sinoviales sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.	Pág. 35
Figura 16	Efecto de Ácido Hialurónico y Condroitín-sulfato sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.	Pág. 37
Figura 17	Efecto de Líquido Sinovial, Acido Hialurónico y Condroitín-Sulfato sobre la oxidación de los Tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.	Pág. 39

RESUMEN

La fisiopatología/etiología de la enfermedad degenerativa articular ha demostrado que esta es una patología asociada a estrés oxidativo. No existen antecedentes concluyentes acerca de la capacidad antioxidante del líquido sinovial (LS). Es por ello, que en este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de Acido Hialurónico (AH), Condroitín-Sulfato (CS) y LS proveniente de la articulación metacarpo falángica equina normal, con daño crónico y con membrana sinovial congestiva. Este efecto se evaluó en un sistema biológico constituido por una fracción enriquecida en retículo endoplásmico de hígado de rata (microsomas) sometida a estrés oxidativo por Fe^{+3} /ascorbato, que es un sistema generador de especies radicalarias del oxígeno.

Los LS de articulación normal y con daño crónico inhibieron significativamente la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{+3} /ascorbato (40%) ($p < 0,05$), efecto que no fue dependiente de la concentración, aunque los volúmenes ensayados de LS fluctuaron entre 10 y 100 μ L. El LS de la articulación con membrana sinovial congestiva, produjo un efecto significativamente menor (16%), el que fue observado sólo con el volumen de 100 μ L. El AH y CS no inhibieron la lipoperoxidación microsómica. Por otro lado, todos LS ensayados presentaron actividad Glutati6n transferasa (GSH-T) equivalente aproximadamente al 10% de la actividad total micros6mica en los LS provenientes de articulación normal y con daño cr6nico y al 12%, en el LS de articulación con membrana sinovial congestiva. M6s a6n, la presencia en los LS, de AH y CS previno el da6o oxidativo sobre la GSH-T micros6mica inducido por Fe^{+3} /ascorbato. Por otra parte, los LS de articulación normal y con da6o cr6nico no afectaron la disminuci6n de los tioles micros6micos inducida por Fe^{+3} /ascorbato; sin embargo, el LS proveniente de la articulaciones con membrana sinovial congestiva, AH y CS la inhibieron significativamente ($p < 0,05$).

Estos resultados indicarían que en los LS existirían diferentes mecanismos antioxidantes, los que estarían asociados a cada condici6n articular. AsÍ el LS de articulación con membrana sinovial congestiva protegi6 los grupos tioles y la actividad GSH-T, mientras que los LS de articulación normal y con da6o cr6nico ejercen una mayor acci6n protectora frente a la lipoperoxidaci6n.

SUMMARY

In the physiopathology/etiology of the degenerative joint disease the free radicals generated by oxidative stress are involved. There is not conclusive information about the antioxidant capacity of synovial fluid. That's why in this study, we evaluated the antioxidant effect of hyaluronic acid, chondroitin-sulfate and synovial fluid of three equine metacarpo phalangeal joint conditions: normal, with chronic damage and with congestive synovial membrane. This effect was assayed in a biologic system of rat liver microsomal fraction treated with Fe^{+3} /ascorbate as a free radical generator system.

The synovial fluid (SF) obtained from normal and chronic damage inhibited in a significant form ($p < 0,05$) the microsomal lipoperoxidation induced by Fe^{+3} /ascorbate (40%), effect not dependent on concentrations, although the volumes studied fluctuated between 10 and 100 μL . The SF from congestive synovial membrane joint inhibited in a lower way the microsomal lipoperoxidation (16%), effect that was only observed with 100 μL . The hyaluronic acid and the chondroitin-sulfate did not inhibit the microsomal lipoperoxidation. On the other hand, glutathione transferase (GSH-T) activity was present in synovial fluids obtained from the three joint conditions, representing the 10% of the total microsomal activity for the SF from normal and chronic damage joints, and 12% from congestive synovial membrane joint. Furthermore the hyaluronic acid, the chondroitin-sulfate and the synovial fluid from the three articular conditions, protect the GSH-T activity against oxidative stress induced by Fe^{+3} /ascorbate. In addition, the SF of normal and chronic damage joints did not protect microsomal thiols content against oxidative stress; however, the synovial fluid from congestive synovial membrane joint, hyaluronic acid and chondroitin-sulfate protect in a significant form the microsomal thiols content against oxidative damage ($p < 0,05$).

These results could indicate that in the SF exists different antioxidant mechanisms associated with each articular condition. So the SF from congestive synovial membrane joint protects the thiols group and the GSH-T activity, while the SF from normal and chronic damage joints protect mainly the lipoperoxidation.

INTRODUCCIÓN

Un trauma, cualquiera sea su naturaleza, produce inflamación en el área afectada, que se traduce en aumento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad capilar y atracción de células fagocitarias al área dañada. Las citoquinas pro-inflamatorias como Interleuquina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se liberan como respuesta al proceso inflamatorio, lo cual conduce a un aumento de la producción de proteinasas que degradan el cartílago articular y de prostaglandina E₂. Esta cascada molecular provoca la disminución de la síntesis de proteoglicanos (PG) y de colágeno tipo II y aumenta su degradación. En estas condiciones el condrocito aumenta la síntesis de enzimas llamadas metaloproteinasas (MMPs), principales mediadores en la degradación de la Matriz extracelular (MEC). El proceso termina con una gran alteración de la MEC que afecta finalmente la función articular (McIlwraith, 1996; Tsuji *et al.*, 2006).

Los macrófagos, neutrófilos y linfocitos que son atraídos a la zona inflamada, desarrollan procesos oxidativos durante el proceso inflamatorio. Estas células se activan mediante citoquinas pro-inflamatorias, produciendo radicales libres que oxidan rápidamente las biomoléculas dañadas de la articulación (Campo *et al.*, 2003a; Kirschvink *et al.*, 2007). Este es un proceso fisiológico, que es regulado por la capacidad antioxidante celular, pero si se prolonga en el tiempo se sobrepasa esta capacidad, condición en la cual se induce estrés oxidativo, debido al desbalance entre los agentes oxidantes y los antioxidantes (Sorg, 2004; Ostalowska *et al.*, 2006).

Las especies reactivas al oxígeno (EROS) son especies oxidantes altamente reactivas y por tanto, capaces de degradar las biomoléculas, entre ellas los componentes de la articulación como son el colágeno, los proteoglicanos y el ácido hialurónico (Auer *et al.*, 1993; Dimock *et al.*, 2000; Ostalowska *et al.*, 2006). Las especies reactivas del oxígeno se generan por reducción parcial del oxígeno molecular, lo cual puede originar especies radicalarias como el anión superóxido (O₂⁻) y el radical hidroxilo (OH[•]). Estas son especies altamente reactivas y su vida media es muy corta

(Lykkesfeldt y Svendsen, 2007; Valko et al., 2007). Una de las vías a través de las cuales se forman EROS son las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. En ellas los metales de transición como hierro o cobre en su estado iónico reducido reaccionan con el oxígeno molecular generando las especies radicalarias del oxígeno (Sorg, 2004).

La capacidad antioxidante celular está constituida por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los mecanismos enzimáticos, las enzimas antioxidantes de mayor importancia son la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) y dentro de los mecanismos no enzimáticos está el Glutatión (GSH) y la vitamina E los cuales a diferencia de las enzimas, se consumen durante su acción antioxidante; sin embargo, ellos son regenerados posteriormente; así el glutatión oxidado es reducido por la glutatión-reductasa que utiliza como agente reductor NADPH. Cabe señalar además, que existe creciente bibliografía que señala a la GSH-transferasa (GSH-T) como enzima reguladora del estrés oxidativo ya que participa en la detoxificación de hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios del estrés oxidativo.

Todos los sistemas antioxidantes mencionados son fundamentales para mantener el equilibrio frente a un desbalance redox como el que ocurre en la enfermedad degenerativa articular. Existen diferentes estudios acerca de la capacidad antioxidante enzimática articular que incluyen a la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa (Alfonso *et al.*, 2007; Ostalowska *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha propuesto que los glicosaminoglicanos, como el ácido hialurónico y el condroitín-4-sulfato podrían actuar como antioxidantes en la lesión articular (Balogh *et al.*, 2003; Campo *et al.*, 2003a; Campo *et al.*, 2003b; Henrotin *et al.*, 2003; Campo *et al.*, 2004; Dechant *et al.*, 2005). Al respecto, se ha descrito que el contenido de ácido hialurónico tiende a disminuir en el líquido sinovial de articulaciones metacarpo falángicas severamente dañadas (Adarmes *et al.*, 2006). Otros autores han descrito un incremento de la capacidad antioxidante en líquido sinovial de articulación enferma medido como inhibición de la oxidación de liposomas por la técnica de TBARS (Dimock *et al.*, 2000); y en líquido sinovial de articulación con daño crónico, medido mediante la técnica de TRAP (Villasante, 2006).

Los antecedentes presentados muestran que no existe claridad sobre la capacidad antioxidante que posee la articulación. Es por ello que en esta memoria de título se evaluó la capacidad antioxidante del ácido hialurónico, el condroitín-6-sulfato y el líquido sinovial proveniente de articulaciones sanas, con daño crónico sin signos de reagudización y articulación con membrana sinovial congestiva sin daño del cartílago. Para generar el estrés oxidativo y evaluar el eventual efecto antioxidante se utilizó Fe^{3+} /ascorbato como sistema generador de radicales libres del oxígeno ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO^{\bullet}) y como sistema biológico una fracción enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Uno de los cuadros clínicos más frecuentes en el equino, es la claudicación por daño articular. Varios estudios epidemiológicos han descrito que este cuadro clínico constituye el factor más importante de invalidez y pérdida de la capacidad de trabajo del equino, por lo que la comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso degenerativo articular, es vital para desarrollar estrategias de prevención y tratamiento (Goodrich y Nixon, 2006).

Caracterización de la Articulación Metacarpo Falángica Equina.

Las extremidades anteriores del equino soportan más del 70% del peso corporal, y por esto sus articulaciones sinoviales cursan habitualmente con procesos inflamatorios y degenerativos. Así, la articulación metacarpo falángica se afecta habitualmente debido a su movilidad y a que debe soportar grandes fuerzas de compresión. La transmisión de fuerzas a través de esta articulación requiere de la integridad de las estructuras que la componen, tales como ligamentos, tendones, membrana sinovial, cartílago articular y hueso subcondral (McIlwraith, 1996).

Articulación Sinovial. Está compuesta de varias estructuras que contribuyen al proceso degenerativo articular. La cápsula articular está formada por dos capas, una externa compuesta de tejido fibroso y una interna, conocida como membrana sinovial. La capa fibrosa o membrana externa, esta unida o muy próxima al borde de la cara articular (Getty, 1982).

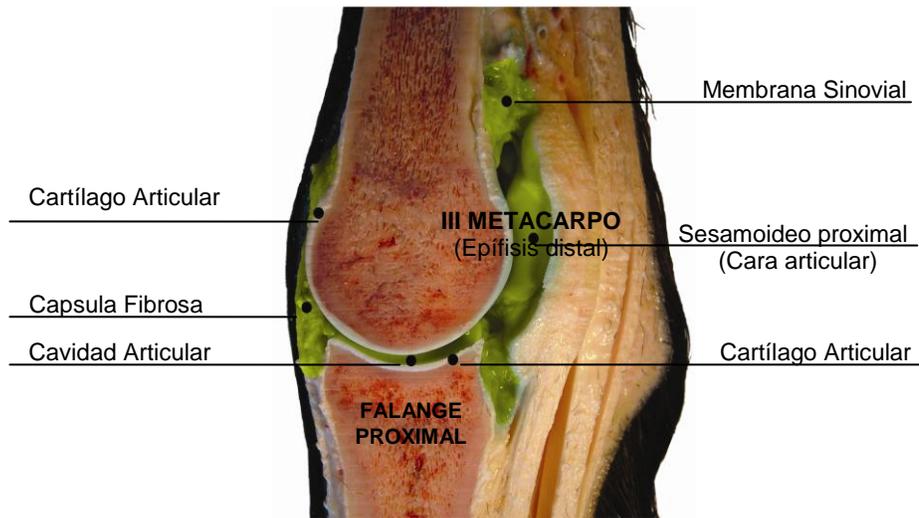


Figura 1: Fotografía corte sagital de la articulación metacarpo falángica equina. (Maximiano Lemaitre y Andrea Müller). El espacio o cavidad articular está coloreada de una tonalidad amarillo-verdoso para diferenciarla del resto de las estructuras de la articulación.

Membrana Sinovial. Reviste la cavidad articular excepto sobre los cartílagos articulares, ya que se inserta en el borde de estos cartílagos. Es una membrana delgada, muy irrigada e innervada, y frecuentemente forma pliegues y vellosidades que se proyectan dentro de la cavidad articular (Getty, 1982). Está formada por sinoviocitos tipo A con actividad fagocítica y por sinoviocitos tipo B que sintetizan la matriz extracelular (Pool, 1996). La membrana sinovial participa en la formación del líquido sinovial, que es un ultrafiltrado del plasma sanguíneo, por lo que su composición química es similar al plasma, al que se adiciona ácido hialurónico producido por los sinoviocitos tipo B de la membrana sinovial (Pool, 1996). Así, en el líquido sinovial se encuentran sinoviocitos y condrocitos, células derivadas de la membrana sinovial y del cartílago respectivamente, y células propias del plasma sanguíneo, como monocitos, linfocitos y polimorfo nucleares (PMN). Este líquido tiene múltiples funciones como lubricar la articulación, transportar material nutritivo hacia el cartílago articular, eliminar productos de desecho del cartílago y amortiguar las fuerzas de presión que soportan estas articulaciones. El líquido sinovial tiene la propiedad de ser muy viscoso debido a su contenido de ácido hialurónico, lo que otorga protección al cartílago al disminuir los efectos de fuerzas y roces, pero también reduce las interacciones entre enzimas, antígenos y citoquinas que pueden ejercer efectos dañinos sobre las células articulares

durante el proceso inflamatorio (Pool, 1996; Todhunter, 1996; Trotter y McIlwraith, 1996; Goodrich y Nixon, 2006).

Cartílago Articular. De naturaleza hialina, recubre las superficies articulares óseas, disminuyendo el efecto de las contusiones violentas y del roce. El cartílago articular carece de nervios y de vasos sanguíneos, por lo que la nutrición de los condrocitos depende del líquido sinovial y de la irrigación del hueso subcondral, todo lo cual regula la función de estas células (Todhunter, 1996; Henrotin *et al.*, 2005; Goodrich y Nixon, 2006; Milner *et al.*, 2006). El cartílago macroscópicamente posee una superficie lisa y un color azulado cuando se examina en fresco, pero estas características cambian en los procesos inflamatorios agudos y crónicos, apareciendo en este último caso focos de erosión y/o líneas de roce (Pool, 1996).

El cartílago articular está compuesto de agua (75%), colágeno (15%), proteoglicanos (10%) y condrocitos (2%). El colágeno tipo II que predomina dentro del cartílago, está constituido por tres cadenas alfa-2 similares que forman finas fibrillas de 10 a 20 nanómetros de diámetro. Su función principal es la resistencia a la presión intermitente, que se asocia a las distintas fuerzas que actúan sobre las fibrillas de colágeno, ejerciendo tracciones y desplazamientos sobre ellas, provocando su compactación y su estiramiento (Ray *et al.*, 1996).

Otro componente del cartílago son los proteoglicanos (PG) que están formados por una proteína central, a la que se unen covalentemente los glicosaminoglicanos (GAGs), siendo el agregán el proteoglicano más abundante en el cartílago articular y el de mayor tamaño (3×10^6 Da). Los GAGs son polisacáridos heterogéneos formados por unidades repetitivas de al menos dos monómeros distintos y cuyo carácter aniónico le permite atraer y retener agua en la matriz extracelular y le confieren, junto con el colágeno, sus propiedades viscoelásticas. Están representados por el ácido hialurónico, condroitín sulfato, keratán sulfato, heparán sulfato y dermatán sulfato I y II. El agregán se organiza formando estructuras supramoleculares de gran tamaño en la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular, a través de su unión no covalente a una molécula de ácido hialurónico. Cada molécula de ácido hialurónico es capaz de

unir hasta 100 moléculas de agregacán. La formación de estos agregados es muy importante desde el punto de vista fisiológico, ya que permite la retención del agregacán y por ende de agua en la MEC del cartílago, asegurándose así la amortiguación normal del cartílago articular (Jackson *et al.*, 1991; Todhunter, 1996).

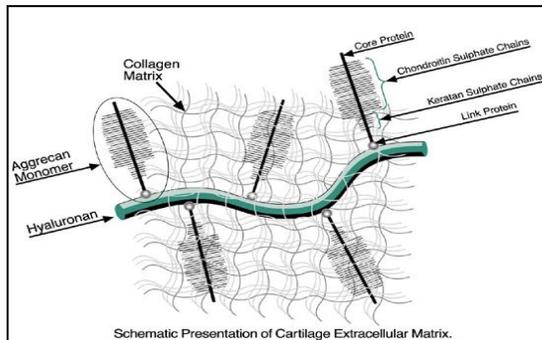


Figura 2: Esquema del Agregacan

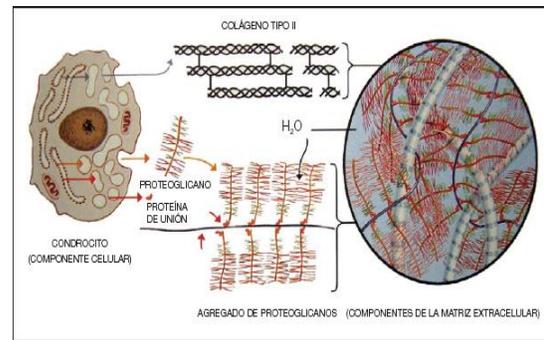


Figura 3: Esquema de la Matriz Extracelular

GAG'S presentes en la articulación. El condroitín-sulfato es uno de los constituyentes principales del cartílago y se caracteriza por su extraordinaria capacidad de fijar agua. Es un GAG de gran tamaño producido por el condrocito, formado por unidades disacáridas de ácido glucurónico y N-acetil-D-galactosamina-sulfato.

El condroitín-sulfato presente en el cartílago maduro es mayoritariamente condroitín-6-sulfato, a diferencia del condroitín-4-sulfato que se encuentra en mayor proporción en cartílagos inmaduros (Todhunter, 1996). En una articulación enferma con procesos degenerativos, debido a la acción de enzimas líticas, se observa una degeneración progresiva del cartílago con pérdida de la estructura de la matriz extra celular (MEC) produciendo una liberación de sus componentes, como el condroitina-sulfato, lo que genera pérdida de la capacidad para retener agua y un deterioro del funcionamiento articular.

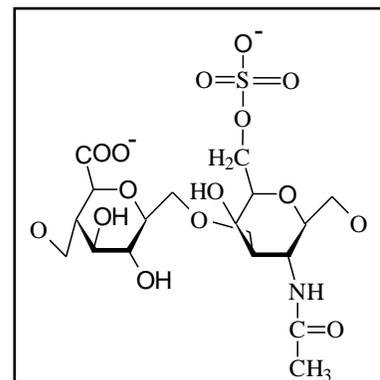


Figura 4: Condroitín-6-Sulfato

Otro componente del cartílago articular es el ácido hialurónico, polímero de ácido glucurónico y *N*-acetilglucosamina unidos alternativamente por enlaces glicosídicos (1-3) y (1-4). El ácido hialurónico presente en el cartílago es producido por los condrocitos, a diferencia de aquel presente en el líquido sinovial que es producido por los sinoviocitos (Howard y McIlwraith, 1996); difiere del resto de los GAGs debido a que carece de grupos sulfato. A través de su interacción con PG y con colágeno, proporciona estabilidad y elasticidad a la matriz extracelular del tejido conectivo. Además, se une por puentes de hidrógeno a diversas proteínas y moléculas de agua para formar un macro-agregado viscoso que regula la homeostasis extracelular. El ácido hialurónico presente en el líquido sinovial, facilita el deslizamiento de las superficies articulares e impide el daño del cartílago articular (Jackson *et al.*, 1991; Balogh *et al.*; 2003; Campo *et al.*, 2003a).

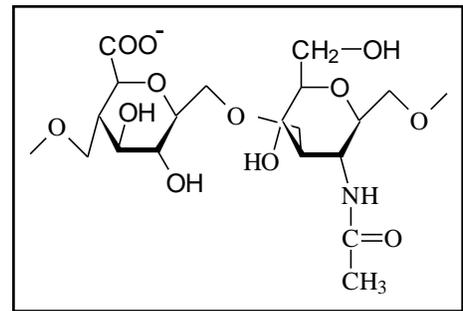


Figura 5: Acido Hialurónico

Todas las estructuras mencionadas de la articulación están involucradas en la enfermedad articular y sin importar la causa primaria, todas ellas juegan un papel importante que contribuye a la patogénesis de la enfermedad articular (Goodrich y Nixon, 2006).

Enfermedad Articular.

Un trauma, cualquiera sea su naturaleza, produce inflamación en el área afectada, que se traduce en aumento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad capilar y atracción de células fagocitarias al área dañada. La vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo originan el calor y el eritema en la zona. El aumento de la permeabilidad capilar lleva a una pérdida de fluido del sistema vascular hacia el tejido y el intersticio, generándose la tumoración característica en el área afectada. Este aumento de la permeabilidad facilita además, la migración de células fagocitarias que liberan sus enzimas lisosomales al tejido dañado. Las células inflamatorias, como

neutrófilos, macrófagos y linfocitos, a su vez, liberan mediadores pro-inflamatorios (citoquinas) que activan a otras células (McIlwraith, 1996).

Las citoquinas inflamatorias como Interleuquina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se liberan como respuesta al proceso inflamatorio, lo cual conduce a un aumento de la producción de proteinasas que degradan el cartílago articular y de prostaglandina E₂. Estos procesos provocan disminución de la concentración de proteoglicanos en la MEC del cartílago al aumentar su degradación y disminuir su síntesis. Estas consecuencias se deben a que la IL-1, en la matriz del cartílago articular, aumenta la concentración intracelular de fosfolipasa A₂, que estimula la liberación de ácido araquidónico, sustrato de la ciclooxigenasa (COX-2) que cataliza la síntesis de prostaglandina E₂ (PG-E₂) que se libera al medio extracelular. El aumento de PG-E₂ aumenta la concentración de AMP_c intracelular, que estimula la producción de proteinasas (principalmente metaloproteiniasas). En estas condiciones el condrocito disminuye la síntesis de colágeno tipo II y de proteoglicanos y aumenta la síntesis de metaloproteiniasas (MMPs), principales mediadores en la degradación de la MEC. El proceso termina con una gran alteración de la MEC lo que afecta finalmente la función articular (McIlwraith, 1996; Tsuji *et al.*, 2006). La siguiente figura esquematiza el proceso inflamatorio y las consecuencias en la articulación.

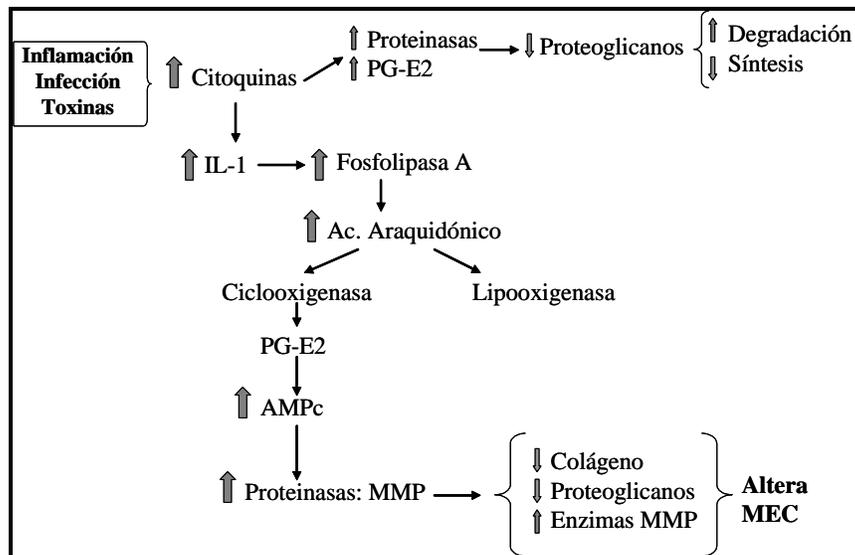


Figura 6: Cascada bioquímica del Proceso inflamatorio articular.

La pérdida de regulación de la síntesis y de la actividad de las MMPs, provoca la pérdida gradual de componentes de la MEC del cartílago lo que conduce finalmente al desarrollo de la enfermedad degenerativa articular (EDA) u osteoartritis. Esta patología se define como una alteración crónica, progresiva y no inflamatoria de las articulaciones móviles y que se caracteriza por degeneración del cartílago articular, formación de osteofitos marginales y cambios articulares proliferativos y degenerativos (Nelson y Couto, 2003).

La degeneración del cartílago se evidencia macroscópicamente por fibrilación, focos de erosión y líneas de roce sobre el cartílago articular (McIlwraith, 1996). Los cambios histológicos incluyen fibrilación superficial, que puede progresar para formar fisuras verticales hasta el hueso subcondral y necrosis de condrocitos (McIlwraith, 1996).

Los macrófagos, neutrófilos y linfocitos son los responsables de los procesos oxidativos que dañan las moléculas en el proceso inflamatorio. Ellos se activan mediante citoquinas inflamatorias, produciendo radicales libres del oxígeno que oxidan rápidamente las biomoléculas dañadas de la articulación (Campo *et al.*, 2003a; Kirschvink *et al.*, 2007). Este es un proceso fisiológico, que es regulado por la capacidad antioxidante celular, pero si se prolonga en el tiempo, la capacidad antioxidante puede ser sobrepasada, condición en la cual se induce estrés oxidativo, debido al desbalance entre los agentes oxidantes y los antioxidantes (Sorg, 2004; Ostalowska *et al.*, 2006).

Papel de las Especies Reactivas al Oxígeno (EROS) en el daño articular.

Las EROS son especies oxidantes altamente reactivas y por tanto, capaces de degradar las biomoléculas, entre ellas los componentes de la articulación como son el colágeno, los proteoglicanos y el ácido hialurónico (Auer *et al.*, 1993; Dimock *et al.*, 2000; Ostalowska *et al.*, 2006).

Las especies reactivas del oxígeno se generan por reducción parcial del oxígeno molecular, entre ellas especies radicalarias como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Estas son especies altamente reactivas y su vida media es muy corta. El H_2O_2 , no constituye un radical libre, pero se considera una especie reactiva del oxígeno; se puede generar por la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007; Valko et al., 2007).

Una de las vías a través de las cuales se forman los EROS son las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. En ellas los metales de transición como hierro o cobre en su estado iónico reaccionan con el oxígeno molecular generando las especies radicalarias del oxígeno (Sorg, 2004).

Ecuación de Haber-Weiss/Fenton:



Capacidad antioxidante celular. La capacidad antioxidante celular está representada por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos:

- Mecanismos enzimáticos. Las enzimas antioxidantes de mayor importancia son la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX).
- Mecanismos no enzimáticos. El Glutatión (GSH) y la vitamina E son importantes compuestos antioxidantes, que a diferencia de las enzimas, se consumen durante su acción antioxidante, pero existen mecanismos fisiológicos que los regeneran.

En relación a las enzimas antioxidantes, la familia de las SOD está constituida por metalo-enzimas que convierten el $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 , las CAT transforman el H_2O_2 en agua y oxígeno molecular, y la GPX reduce hidroperóxidos a alcoholes y utiliza el GSH como agente reductor transformándolo en glutatión oxidado (GSSG) el cual es reducido nuevamente mediante la GSH-reductasa (GR) enzima que utiliza NADPH como agente reductor (Campo *et al.*, 2003a; Sorg, 2004; Alfonso *et al.*, 2007; Kirschvink *et al.*, 2007; Lykkesfeldt y Svendsen, 2007). El siguiente esquema refleja la actividad de las diferentes enzimas con actividad antioxidante:

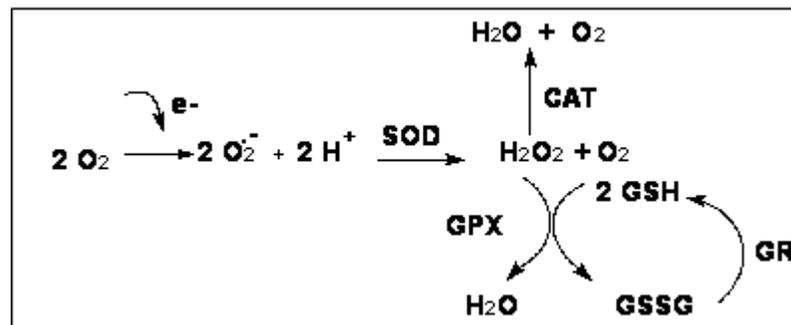


Figura 7: Actividad de enzimas antioxidantes.

Cabe señalar además que existe creciente bibliografía que señala a la GSH-transferasa (GSH-T) como enzima reguladora de estrés oxidativo. Se describen isoformas de esta enzima, como las citosólicas y las unidas a membrana. Estas isoformas están involucradas en la detoxificación de carcinógenos, contaminantes ambientales, agentes antitumorales e hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios del estrés oxidativo. Todas estas moléculas tienen como característica común, ser altamente electrofílicas (Hayes *et al.*, 2005). Así estas enzimas catalizan una variedad de reacciones de conjugación de compuestos electrofílicos y lipofílicos con glutatión (GSH). Más aún, las GSH-T son capaces de unir reversiblemente una serie de compuestos lipofílicos y actuar como transportadores intracelulares, similar al rol que cumple la albúmina en la sangre. También, estas enzimas unen covalentemente un amplio espectro de compuestos electrofílicos y lipofílicos en forma irreversible y posteriormente la enzima unida al electrófilo es degradada (Ketterer y Chritodoulides, 1969). Además, existen antecedentes que indican que la enzima

microsómica (ligada a membrana del retículo endoplásmico hepático) posee también actividad peroxidásica (Mosialou y Morgenstern, 1989).

Todos los sistemas antioxidantes mencionados son fundamentales para mantener el equilibrio frente a un desbalance redox como el que ocurre en la enfermedad degenerativa articular. Existen diferentes estudios acerca de la capacidad antioxidante enzimática articular: que incluyen a la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa (Alfonso *et al.*, 2007; Ostalowska *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha propuesto que los glicosaminoglicanos, como el ácido hialurónico y el condroitín-4-sulfato podrían actuar como antioxidantes en la lesión articular (Balogh *et al.*, 2003; Campo *et al.*, 2003a; Campo *et al.*, 2003b; Henrotin *et al.*, 2003; Campo *et al.*, 2004; Dechant *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que el contenido de ácido hialurónico tiende a disminuir en el líquido sinovial de articulaciones metacarpo falángicas severamente dañadas (Adarmes *et al.*, 2006), y también un incremento de la capacidad antioxidante total en cuadros inflamatorios agudos (Dimock *et al.*, 2000) y en cuadros articulares crónicos no inflamatorios (Villasante, 2006). Estos antecedentes muestran que no existe claridad sobre la capacidad antioxidante de los glicosaminoglicanos. Es por ello que en esta memoria de título se evaluó la capacidad antioxidante del ácido hialurónico, el condroitín-6-sulfato y el líquido sinovial proveniente de articulaciones sanas, con daño crónico sin signos de reagudización y articulación con membrana sinovial congestiva sin daño del cartílago. Para generar el estrés oxidativo se utilizó Fe^{3+} /ascorbato como sistema generador de radicales libres del oxígeno ($\text{O}_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot}) y como sistema biológico para evaluar el eventual efecto antioxidante, una fracción enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas).

HIPÓTESIS

El ácido hialurónico, el condroitín-6-sulfato y el líquido sinovial de la articulación metacarpo falángica equina presentan capacidad antioxidante.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante de líquido sinovial de la articulación metacarpo falángica equina normal, con daño crónico y con membrana sinovial congestiva, y de ácido hialurónico y condroitín-6-sulfato, componentes del líquido sinovial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la inhibición de la lipoperoxidación microsómica con líquido sinovial de articulación metacarpo falángica equina normal, alterada en forma crónica y de articulación con membrana sinovial congestiva.
- Evaluar la inhibición de la lipoperoxidación microsómica con ácido hialurónico y condroitín-6-sulfato.
- Determinar y comparar la actividad GSH-T del líquido sinovial, obtenido de articulación metacarpo falángica equina normal, alterada en forma crónica y de articulación con membrana sinovial congestiva.
- Evaluar el efecto protector de ácido hialurónico, condroitín-sulfato y líquido sinovial sobre la actividad GSH-T sometida a estrés oxidativo inducido por Fe^{3+} /ascorbato.
- Evaluar el efecto protector de líquido sinovial, ácido hialurónico y condroitín-sulfato sobre el contenido de tioles en condiciones de estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Reactivos como cloruro de potasio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), reactivo de Folin-Ciocalteau-fenol, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), ascorbato de sodio, carbonato de sodio y cloruro férrico se obtuvieron de Merck Chile. La albúmina de bovino fracción IV, el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), el glutatión reducido (GSH) y el condroitín-sulfato, se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). El 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (1-Cl-2,4-DNB), fue obtenido de Acros Organics (New Jersey, USA). El ácido hialurónico fue obtenido de Tecnofarma S.A.

Material Biológico

Líquido Sinovial. Se utilizó líquido sinovial (LS) obtenido por artrocentesis aséptica desde la articulación metacarpo falángica de equinos criollos recién beneficiados en el matadero "La Pintana" (Región Metropolitana). Se seleccionaron según inspección macroscópica, 18 articulaciones normales y 18 articulaciones alteradas crónicamente sin procesos inflamatorios agudos evidentes ni con derrame sanguinolento en el LS. Las articulaciones macroscópicamente sanas presentaron un cartílago blanco nacarado con su superficie lisa y brillante, una membrana sinovial no congestiva y líquido sinovial amarillo, transparente y sin sangre. Por el contrario, las articulaciones con daño crónico presentaron cambio de color del cartílago, con focos de erosión y/o líneas de roce, descartándose las articulaciones con membrana sinovial congestiva y líquidos sinoviales con signos de derrame sanguinolento, ya que indican una inflamación aguda (McIlwriath, 1996). Además utilizando el mismo criterio macroscópico, se seleccionaron 6 muestras con presencia de congestión de la membrana sinovial (MS), sin derrame sanguinolento del LS, sin aumento del volumen articular y con un cartílago articular normal a la inspección macroscópica. Una vez

obtenidas las muestras, se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada SORVALL Superspeed modelo RC2-B. Los sobrenadantes se dispusieron en alícuotas en tubos eppendorf de 1,7 ml previamente rotulados y congelados a -76°C hasta su procesamiento. Se recolectaron volúmenes iguales de cada muestra de líquido sinovial y se agruparon en 3 "pool": a) normal, b) con daño crónico y c) con membrana sinovial (MS) congestiva. A continuación se muestran fotografías de las diferentes condiciones articulares:

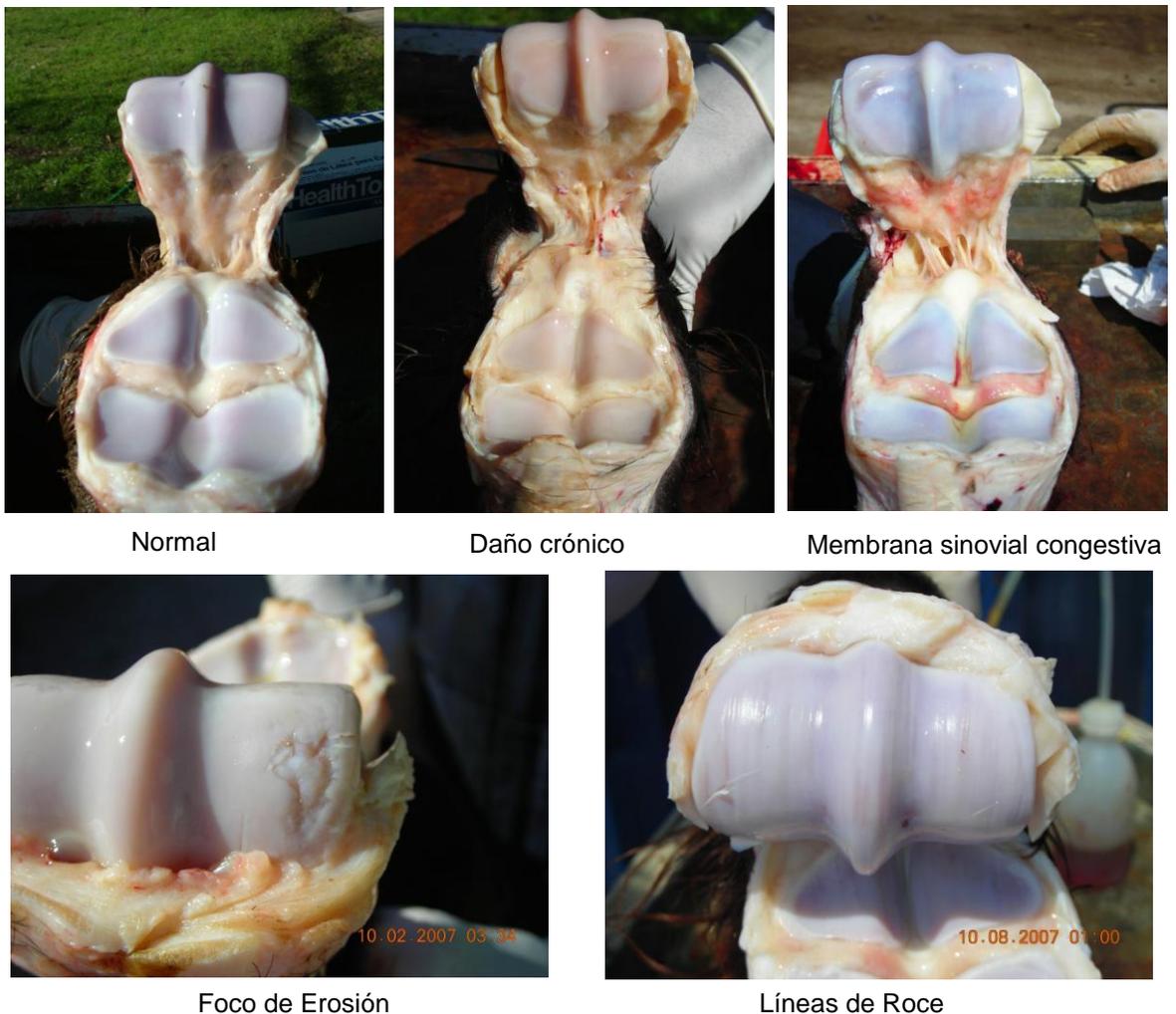


Figura 8: Fotografías de diferentes condiciones de la articulación metacarpo falángica equina.
Maximiano Lemaitre y Andrea Müller.

De acuerdo a la inspección macroscópica *post mortem*, se escogieron aquellas articulaciones con concentraciones de proteínas hasta 15 mg/ml, determinada mediante el método de Lowry *et al.* (1951). El promedio de proteína de las muestras de líquido sinovial normal fue $8,96 \pm 0,6$ mg/mL, para las muestras con daño crónico, $10,06 \pm 0,5$ mg/mL y para el LS de articulación con membrana sinovial congestiva, $8,5 \pm 1,9$ mg/mL.

La selección de las muestras fue llevada a cabo en forma similar a trabajos anteriores desarrollados en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Villasante, 2006). Cabe señalar que en la selección de las muestras para este estudio no se consideró la edad ni el sexo de los animales.

Animales de experimentación. Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley de dos meses y medio de edad cuyo peso corporal fluctuó entre 200 a 250 g. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de pellet Kimber, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21° C. Estos animales se obtuvieron del vivero de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Preparación de microsomas hepáticos de rata. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 15 horas previas al sacrificio, con agua *ad libitum*. Al cabo de este período, los animales se sacrificaron de acuerdo a los métodos aceptados por la “Asociación Médico Veterinaria de América” (www.ivis.org) y la “Asociación Chilena de Ciencias de Animales de Laboratorio (ASOCHICAL)”, el que contempla la utilización de una guillotina especial para realizar la decapitación de los animales, procurando una muerte rápida, con mínimo sufrimiento.

Los hígados se perfundieron, *in situ*, con 4 volúmenes de 20 mL de NaCl 0,9% P/V. Se extirparon, se limpiaron de tejido conectivo y vasos sanguíneos y se pesaron. Luego, se preparó un homogeneizado total al 20% en KCl 1,15% P/V, el cual se centrifugó a 9.000 x g durante 15 min en una centrífuga refrigerada (4°C) Heraeus Sepatech modelo Suprafuge 22, para sedimentar células intactas, núcleos, mitocondrias y restos de tejido. El sedimento de esta centrifugación se eliminó y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante una hora en una ultracentrífuga refrigerada (4°C) Beckman modelo XL-90. El sedimento de esta centrifugación corresponde a la fracción microsómica enriquecida en retículo endoplásmico y el sobrenadante corresponde a la fracción citosólica.

Métodos

- 1. Determinación de proteínas totales.** La concentración de proteína de la fracción microsómica y de cada "pool" de líquido sinovial, se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Lowry *et al.*, (1951), utilizando como estándar albúmina de bovino fracción IV.
- 2. Determinación de lipoperoxidación microsómica.** La lipoperoxidación se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por el método descrito en Letelier *et al.*, (2005). Esta técnica mide la absorbancia a 532 nm del complejo formado entre el malondialdehído (MDA), producto de la reacción lipoperoxidativa y el ácido tiobarbitúrico (TBA).

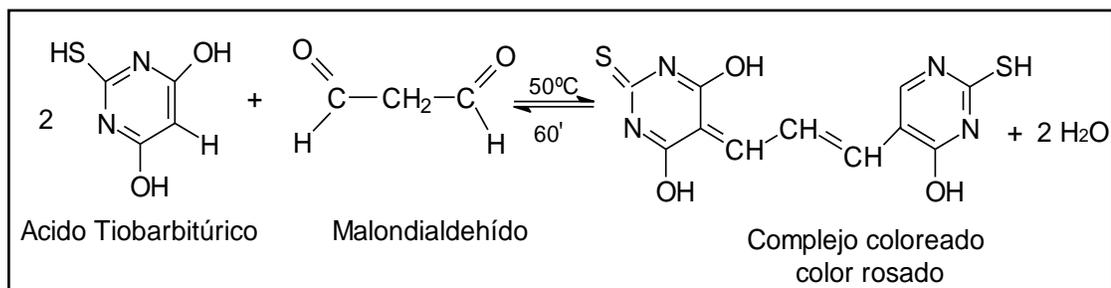


Figura 9: Reacción de condensación de Acido Tiobarbitúrico y Malondialdehído.

La mezcla de reacción contenía (en 1 mL volumen final): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; 1,0 mg de proteína microsómica; FeCl₃ 600 μM; ascorbato 1 mM. Los blancos contenían todos los reactivos a excepción de la proteína microsómica. Luego, las muestras y los blancos se incubaron durante 10 minutos a 37°C en un baño termostático (Julabo modelo SW-21C), con agitación constante. Al cabo de este período, las proteínas se precipitaron agregando 500 μL de TCA 20% p/v en frío (4°C). Luego, las muestras se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Para desarrollar la reacción colorimétrica, alícuotas de 500 μL de los sobrenadantes se mezclaron con 500 μL de TBA 1% p/v y se incubaron durante 60 minutos a 50°C con agitación constante. A continuación, se leyó la absorbancia de las muestras a 532 nm contra sus blancos respectivos, en un espectrofotómetro (UNICAM VIS Modelo 3), acoplado a un computador. Los resultados se expresaron como nmoles TBARS /minuto /mg proteína microsómica usando para ello el coeficiente de extinción de 153 mM⁻¹ x cm⁻¹ del complejo según lo descrito por Letelier *et al.*, (2005).

Para determinar el efecto antioxidante de los líquidos sinoviales (LS) en estudio, ácido hialurónico (AH) y condroitín-sulfato (CS) sobre la lipoperoxidación microsómica, el orden de agregado fue el siguiente: amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; 1,0 mg de proteína microsómica; la muestra en estudio (LS, AH y CS); FeCl₃ 600 μM y ascorbato 1 mM. Esta mezcla se incubó durante 10 min a 37°C en un baño termostático (Julabo modelo SW-21C), con agitación constante. Al cabo de este período, las proteínas se precipitaron agregando 500 μL de TCA 20% p/v en frío (4°C), y se continuó con la técnica descrita en el párrafo anterior.

3. Actividad Glutación-Transferasa (GSH-T): Conjugación de 1-CI-2,4-DNB con GSH. La actividad GSH-transferásica microsómica y de los líquidos sinoviales se determinó por el método descrito por Habig *et al.* (1974). La conversión del sustrato en conjugado de GSH, produce un cambio en las propiedades espectrales del sustrato que se aprovecha para cuantificar la actividad de la enzima. El conjugado formado posee una absorbancia máxima a 340 nm y su coeficiente de extinción es 9,6 mM⁻¹ x cm⁻¹.

La ecuación química que representa la reacción enzimática es la siguiente:

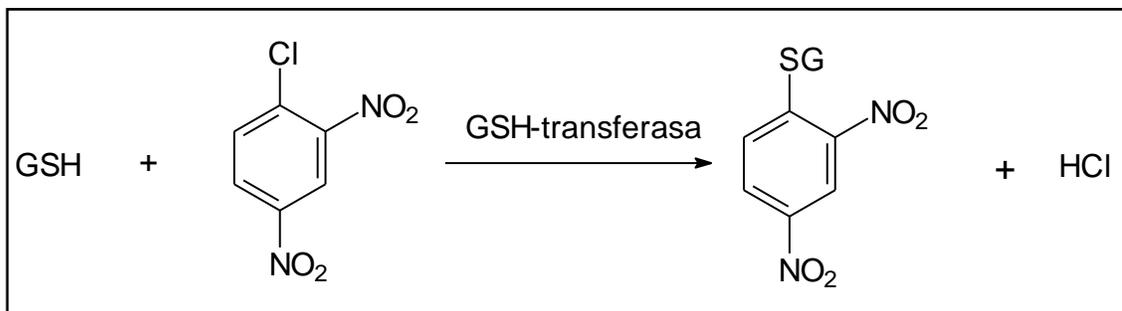


Figura 10: Conjugación de Glutación (GSH) con 1-cloro-2,4-DNB

La mezcla de reacción contenía (en 1 mL volumen final): amortiguador fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5; proteína microsómica 100 μ g; GSH 4,0 mM; 1-Cl-2,4-DNB 1,0 mM. Se utilizó como blanco un sistema que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, omitiendo la proteína microsómica. La reacción se inició agregando el GSH y el ensayo enzimático se realizó a 25 °C. La velocidad de reacción se determinó midiendo en forma continua el aumento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UNICAM VIS modelo 3, termorregulado y acoplado a un computador. La actividad GSH-T microsómica fue expresada en nmoles de conjugado formado /minuto /mg de proteína microsómica.

La actividad GSH-T de los LS se determinó usando volúmenes de 100 μ L de cada uno de ellos. Para la determinación del efecto antioxidante de los LS, AH y CS sobre el daño oxidativo a la GSH-T inducido por Fe³⁺/ascorbato, la mezcla constituida por el amortiguador fosfato, microsomas, la muestra en estudio (LS, AH, CS) y Fe³⁺/ascorbato, se incubó 15 min antes de determinar la actividad GSH-T microsómica de acuerdo al método descrito.

4. Determinación de tioles totales. La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier *et al.*, (2005). Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es 13.600 M⁻¹ x cm⁻¹.

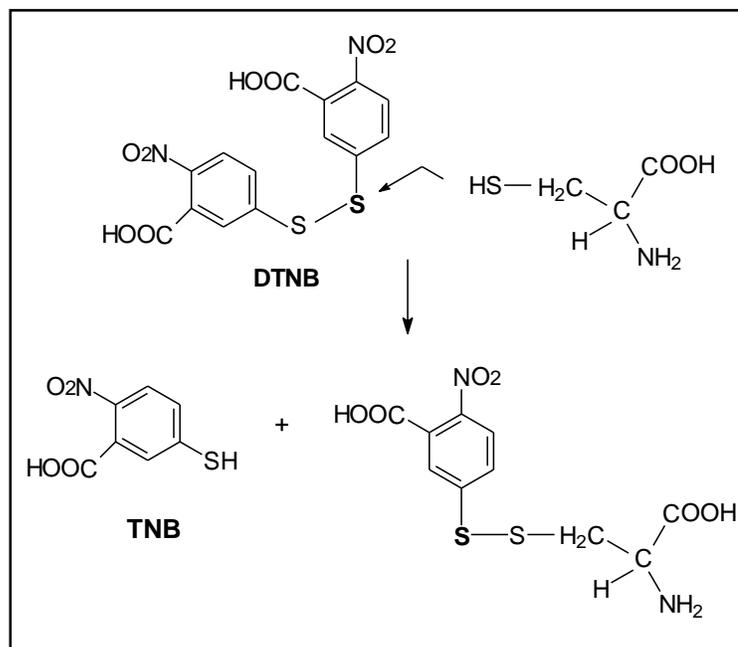


Figura 11: Reacción de tioles con DTNB

La mezcla de reacción contenía (en 1 mL volumen final): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 1,0 mg/mL; DTNB 0,6 mM. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37°C en un baño termostático con agitación constante. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la proteína microsómica. A continuación, se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV/VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. El contenido de tioles fue expresado en nmoles de tioles totales /mg de proteína microsómica.

Para determinar el efecto antioxidante sobre la concentración de tioles totales microsómicos, la mezcla constituida por el amortiguador fosfato, microsomas, la muestra en estudio (LS, AH, CS) y Fe³⁺/ascorbato, se incubó 15 min antes de adicionar el DTNB que reacciona con los grupos tiólicos libres formando el conjugado coloreado que es el que se cuantifica espectrofotométricamente.

Análisis estadístico. Los resultados se expresaron como el promedio de los valores obtenidos de 4 mediciones independientes de cada experimento realizado en duplicado \pm la desviación estándar de las muestras en relación con sus promedios; se exigió en cada caso un 95% de certeza. Con el fin de establecer si las diferencias entre los grupos controles y experimentales eran estadísticamente significativas se realizó un ANDEVA de una y dos vías. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa computacional GraphPad Prisma 5 Demo (2007).

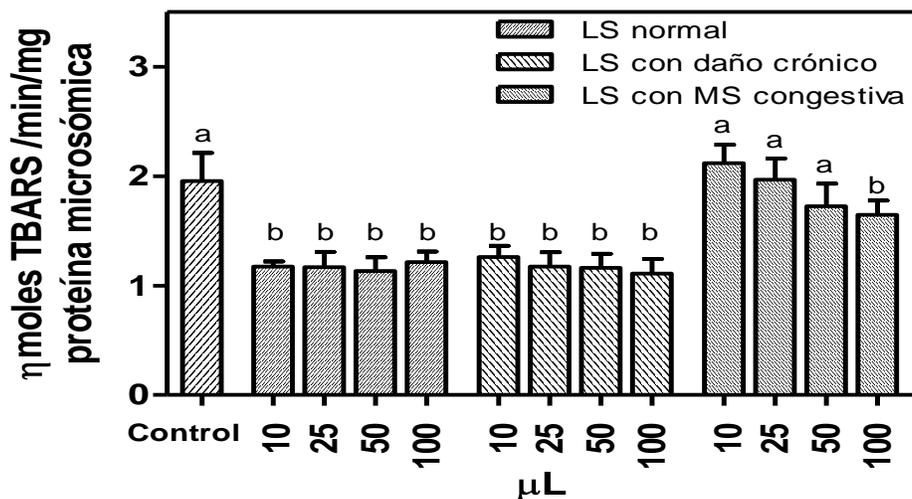
RESULTADOS

Efecto de Líquido Sinovial sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. Como muestra la figura 12, el líquido sinovial (LS) normal y el obtenido de articulaciones con daño crónico inhibieron aproximadamente 40% la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato ($p < 0,05$); sin embargo, no se observó diferencias entre los volúmenes ensayados de ambos LS, aunque el rango utilizado fluctuó entre 10 y 100 μL . No obstante, el efecto antioxidante del LS obtenido de articulaciones con membrana sinovial congestiva mostró una aparente dependencia de la concentración del LS; “aparente” porque aunque la magnitud de los valores obtenidos fue diferente, sólo el volumen de 100 μL mostró una diferencia significativa con el valor del control considerado como 100% de lipoperoxidación ($p < 0,05$).

Efecto de Acido Hialurónico y Condroitín-6-sulfato sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. Para evaluar el posible efecto antioxidante del ácido Hialurónico (AH) se eligieron dos concentraciones 0,312 mg/mL y 0,625 mg/mL, valores que bordean la concentración fisiológica en el LS, 0,5 mg/mL (Todhunter, 1996). Como una forma de comparar la actividad antioxidante del condroitín-6-Sulfato (CS) con la del AH, se utilizaron concentraciones iguales de CS.

AH y CS no inhibieron la lipoperoxidación inducida por Fe^{3+} /ascorbato como se muestra en la figura 13; aunque se observaron diferencias en los valores de lipoperoxidación respecto del control, éstas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, la mezcla de 0,312 mg/mL de AH más 0,312 mg/mL de CS provocó un 17% de inhibición de la lipoperoxidación microsómica, valor estadísticamente diferente al control ($p < 0,05$).

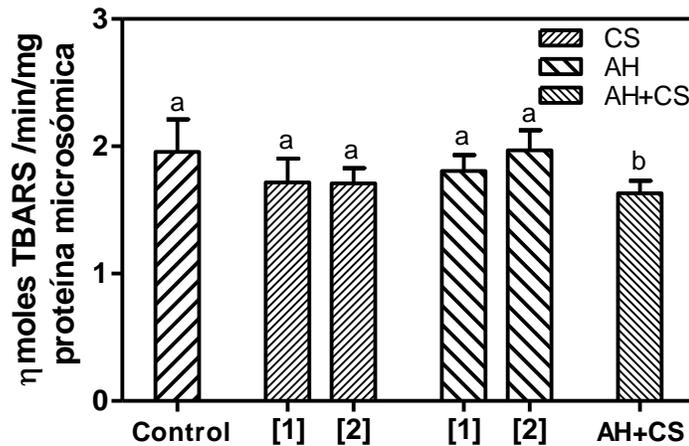
Figura 12: Efecto de Líquido Sinovial sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.



nmoles TBARS /min/mg proteína microsómica												
Control	LS normal (μL)				LS con daño crónico (μL)				LS con MS congestiva (μL)			
	10	25	50	100	10	25	50	100	10	25	50	100
1,954 ± 0,2544	1,173 ± 0,0469	1,167 ± 0,1400	1,134 ± 0,1248	1,215 ± 0,0972	1,262 ± 0,1009	1,175 ± 0,1292	1,162 ± 0,1279	1,111 ± 0,1333	2,118 ± 0,1695	1,967 ± 0,1967	1,725 ± 0,2071	1,647 ± 0,1316

- [Proteína microsómica]: 100 μg/mL; [FeCl_3]: 600 μM; [ascorbato]: 1 mM.
- Control: microsomas en ausencia de LS
- El ensayo lipoperoxidativo está descrito en Métodos.
- Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± D.S. “a”: valores no estadísticamente diferentes al valor Control ($p > 0,05$). “b”: valores estadísticamente diferentes al valor Control ($p < 0,05$).

Figura 13: Efecto de Acido Hialurónico y Condroitín-Sulfato sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.



nmoles TBARS /min/mg proteína microsómica					
Control	CS		AH		AH + CS
	[1]	[2]	[1]	[2]	[1] + [1]
1,957 ± 0,2544	1,716 ± 0,1888	1,709 ± 0,1196	1,806 ± 0,1264	1,968 ± 0,1574	1,631 ± 0,0979

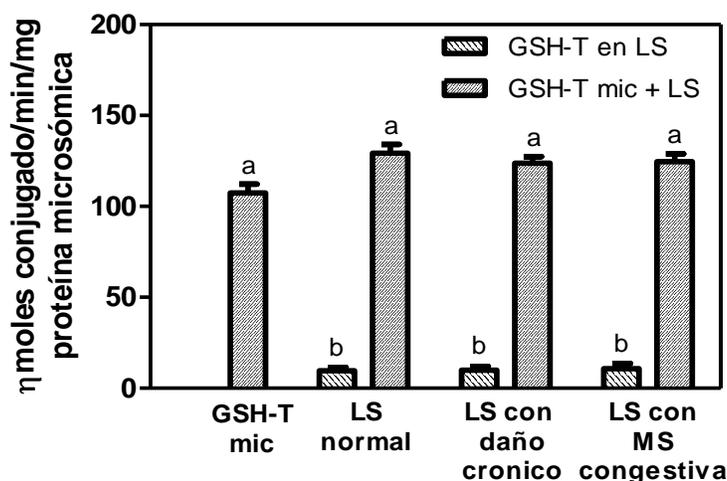
- [Proteína microsómica]: 100 µg/mL; [FeCl₃]: 600 µM; [ascorbato]: 1 mM.
- CS [1]: 0,312 mg/mL; CS [2]: 0,625 mg/mL; AH [1]: 0,312 mg/mL; AH [2]: 0,625 mg/mL y CS+AH: 0,312 mg/mL de CS y AH.
- El ensayo lipoperoxidativo está descrito en Métodos.
- Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± D.S. “a”: valores no estadísticamente diferentes al valor Control (p>0,05). “b”: valores estadísticamente diferentes al valor Control (p<0,05).

Actividad GSH-Transferasa en LS. La GSH-transferasa (GSH-T) regula diferentes procesos oxidativos fisiológicos y cataliza la conjugación con GSH de electrófilos altamente reactivos (Letelier et al., 2006). Es por ello que postulamos que esta enzima podría representar uno de los mecanismos antioxidantes del LS. Los tres LS presentaron actividad GSH-T equivalentes: ~10 nmoles de conjugado/min/100 μ L de líquido sinovial. Sin embargo al expresar esta actividad enzimática como nmoles de conjugado/min/mg de proteína de LS se observó que el LS con membrana sinovial congestiva es aproximadamente un 20% mayor (12.7 nmoles de conjugado/min/mg de proteína de LS con membrana sinovial congestiva). No obstante, los tres valores no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$). Cabe señalar, que la actividad GSH-T encontrada en los LS es equivalente aproximadamente al 10% de la actividad microsómica hepática, considerada como la actividad GSH-T unida a membrana más alta, encontrada en organismos animales. Más aún, al determinar la actividad GSH-T microsómica en presencia de LS, se observó un aumento que representa la suma de las actividades GSH-T de los LS más la microsómica, siendo los tres valores no estadísticamente diferentes entre sí, $p > 0,05$ (Figura 14).

Efecto antioxidante de los LS sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El sistema oxidativo Fe^{3+} /ascorbato disminuyó significativamente la actividad GSH-T microsómica en aproximadamente un 40%. La actividad GSH-T medida en presencia de los tres LS ensayados y Fe^{3+} /ascorbato fue significativamente mayor a aquella medida en ausencia de los LS ($p < 0,05$); el aumento provocado por el LS proveniente de articulación con membrana sinovial congestiva fue 39%, LS con daño crónico, 26% y LS normal, 16% (Figura 15).

Efecto de Ácido Hialurónico y Condroitín-6-sulfato sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. Ambos compuestos, AH y CS, disminuyeron significativamente la inhibición oxidativa de la GSH-T microsómica inducida por Fe^{3+} /ascorbato; sin embargo, los valores de la actividad enzimática residual en presencia de AH y CS no fueron estadísticamente diferentes entre sí, $p < 0,05$ (Figura 16).

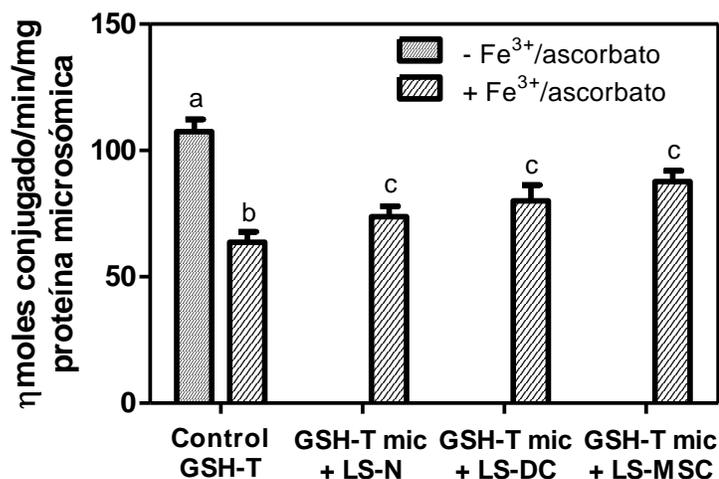
Figura 14: Actividad GSH-T microsómica y en los Líquidos Sinoviales.



	LS normal		LS con daño crónico		LS con MS congestiva	
	GSH-T en LS	GSH-T mic + LS	GSH-T en LS	GSH-T mic + LS	GSH-T en LS	GSH-T mic + LS
	10,6 ± 1,84	129,3 ± 4,76	9,9 ± 1,94	123,8 ± 3,63	12,7 ± 2,80	124,6 ± 4,30

- [Proteína microsómica]: 100 µg/mL; [GSH]: 4 mM; [1-CI-2,4-DNB]: 1 mM; [LSs]: 100 µL /mL de cada uno de ellos.
- La actividad GSH-T microsómica esta expresada como nmoles de conjugado/min/mg de proteína microsómica; la de los LS, como nmoles de conjugado/min/mg de proteína de líquido sinovial y la de las mezclas de microsomas y LS, como nmoles de conjugado/min/mg de proteína microsómica.
- La determinación de actividad GSH-T se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos.
- Cada valor de velocidad representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± D.S. “a”: valor estadísticamente diferente a los valores “b” (p<0,05); valores “a” y “b” no estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05).

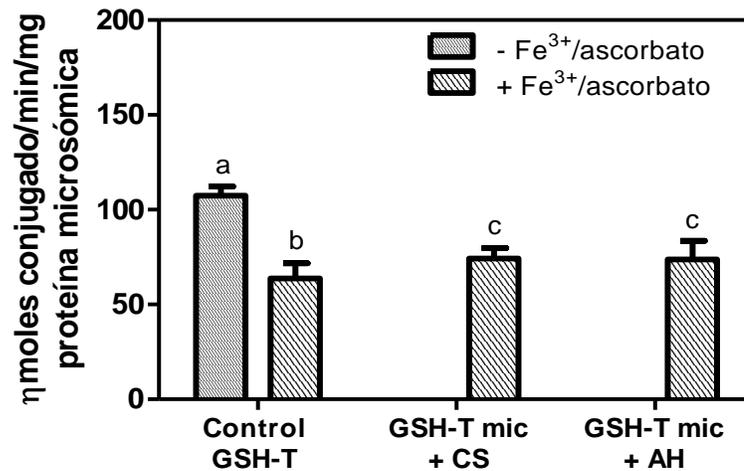
Figura 15: Efecto de los Líquidos Sinoviales sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.



nmoles conjugado/min/mg proteína microsómica				
GSH-T mic		GSH-T mic + LS normal	GSH-T mic + LS con daño crónico	GSH-T mic + LS con MS congestiva
(-) Fe ³⁺ /ascorbato		(+) Fe ³⁺ /ascorbato		
107,4 ± 4,91	63,7 ± 4,08	73,8 ± 4,08	80,1 ± 6,24	88,7 ± 4,23
% Actividad residual	59,3	68,7	74,6	82,6

- [Proteína microsómica]: 100 µg/mL; [GSH]: 4 mM; [1-Cl-2,4-DNB]: 1 mM; [FeCl₃]: 600 µM; [ascorbato]: 1 mM; [LSs]: 100 µL de cada uno de ellos.
- La actividad GSH-T se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos.
- Cada valor de velocidad representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± D.S. “a”, “b” y “c”: valores estadísticamente diferentes (p<0,05); valores “c” estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05).

Figura 16: Efecto de Ácido Hialurónico y Condroitín-sulfato sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.

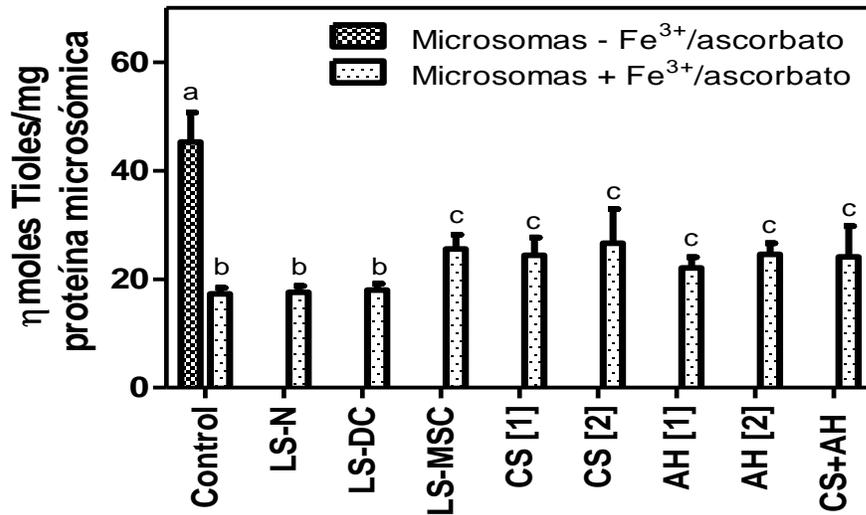


nmoles conjugado/min/mg proteína microsómica			
GSH-T mic		GSH-T mic + CS	GSH-T mic + AH
(-) Fe ³⁺ /ascorbato	(+) Fe ³⁺ /ascorbato		
107,4 ± 4,91	63,7 ± 4,08	85,8 ± 3,45	79,0 ± 3,86
% Actividad residual	59,3	79,9	73,6

- [Proteína microsómica]: 100 µg/mL; [GSH]: 4 mM; [1-Cl-2,4-DNB]: 1 mM; [FeCl₃]: 50 µM; [ascorbato]: 1 mM; [AH]: 0,625 mg/mL; [CS]: 0,625 mg/mL.
- La actividad GSH-T se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos.
- Cada valor de velocidad representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± D.S. “a”, “b” y “c”: valores estadísticamente diferentes (p<0,05); valores “c” no estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05).

Efecto antioxidante de los Líquidos Sinoviales, Acido Hialurónico y Condroitín-6-Sulfato sobre la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. Este sistema oxidante disminuyó los tioles microsómicos 61,8%. Los LS proveniente de articulación normal y con daño crónico no modificaron la disminución de los tioles microsómicos inducida por Fe^{3+} /ascorbato ($p>0.05$). Sin embargo, el LS proveniente de articulación con membrana sinovial congestiva, CS y AH previnieron significativamente la oxidación de estos tioles en igual extensión; así disminuyeron 45,8% los tioles microsómicos, valor inferior al del control, 61,8% (Figura 17).

Figura 17: Efecto de Líquido Sinovial, Acido Hialurónico y Condroitín-Sulfato sobre la oxidación de los Tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.



nmoles de tioles/mg prot microsómica	
Control - Fe^{3+} /asc	Control + Fe^{3+} /asc
45,3 ± 11,40	17,3 ± 1,12
+ LS Normal	+ LS con Daño Crónico
17,6 ± 1,18	18,0 ± 1,14
+ LS con MS Congestiva	+ CS [1]
25,6 ± 2,63	24,4 ± 3,29
+ CS [2]	+ AH [1]
26,6 ± 6,35	22,1 ± 1,96
+ AH [2]	+ CS+AH
24,6 ± 2,05	24,1 ± 5,69
% Tioles residuales	
38,2	38,9
39,7	56,5
53,9	53,9
58,7	48,9
48,9	54,3
54,3	53,2

- [Proteína microsómica]: 100 μ g/mL; [$FeCl_3$]: 50 μ M; [ascorbato]: 1 mM; [DTNB]: 0,6 mM; [LSs]: 100 μ L de cada uno de ellos; AH [1]: 0,312 mg/mL; AH [2]: 0,625 mg/mL; CS [1]: 0,312 mg/mL; CS [2]: 0,625 mg/mL y CS+AH: 0,312 mg/mL de CS y AH.
- La concentración de tioles se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos.
- Cada valor representa el promedio de al menos 4 determinaciones independientes \pm D.S. "a", "b" y "c": valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$); valores "b" y "c" no estadísticamente diferentes entre sí ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Diferentes autores han estudiado la capacidad antioxidante de líquido sinovial (LS) equino en diferentes modelos articulares, a través de diferentes técnicas y utilizando distintos sistemas biológicos (Dimock *et al.*, 2000; Villasante, 2006). Se ha planteado que el condroitín-sulfato (CS) y el ácido hialurónico (AH) podrían estar involucrados en la capacidad antioxidante articular; sin embargo, no existen antecedentes concluyentes acerca de esta capacidad. Por esto, en este trabajo se estudió la capacidad antioxidante de LS proveniente de articulación normal, con daño crónico y con membrana sinovial congestiva, debido a que se ha demostrado que patologías asociadas a estrés oxidativo inducen los mecanismos antioxidantes celulares y la osteoartritis es una de ellas (Goodrich y Nixon, 2006; Ostalowska *et al.*, 2006; Lykkesfeldt y Svendsen, 2007).

La célula posee mecanismos antioxidantes celulares que actúan a nivel de membranas y en el citosol. Por lo tanto, la elección del sistema biológico a utilizar debe ser considerada para determinar la protección que los antioxidantes ejercen sobre las biomoléculas. Más aún, las biomoléculas que actúan como antioxidantes celulares (enzimáticos y no-enzimáticos) son regeneradas posteriormente por la propia célula, condición que no siempre se cumple con antioxidantes sintéticos. Dada la diversidad de sistemas utilizados previamente para estudiar la capacidad antioxidante de LS, se eligió como sistema biológico una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático (microsomas) y como agente oxidante Fe^{3+} /ascorbato, sistema generador de EROS vía reacción de Haber-Weiss y/o Fenton. Estas membranas biológicas están constituidas por fosfolípidos y proteínas; y la actividad biológica de varias de estas proteínas depende del estado redox de sus grupos tiólicos.

Al estudiar el efecto antioxidante de los LSs (LS proveniente de articulación normal, con daño crónico y con membrana sinovial congestiva) sobre la lipoperoxidación inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato, se observó que todos ellos inhibieron este fenómeno oxidativo. Sin embargo, aunque se utilizó un rango de volúmenes que fluctuó entre 10 y 100 μL , la inhibición provocada por los LS

provenientes de articulación normal y con daño crónico no fue dependiente del volumen utilizado, encontrándose una inhibición de 40%, similar para todos los volúmenes analizados (Figura 12). El LS proveniente de la articulación con membrana sinovial congestiva sin embargo, tuvo un efecto inhibitorio significativamente menor (16%), el cual sólo fue observado al adicionar 100 μ L de este LS a la mezcla de reacción (Figura 12). Esto último se debió probablemente a que los mecanismos antioxidantes disminuyeron producto de su consumo en el propio proceso patológico de la articulación. La no dependencia de la concentración de LS proveniente de articulaciones en las cuales los procesos inflamatorios están ausentes es sorprendente, lo que podría deberse a la existencia de un mecanismo antioxidante diferente en estas articulaciones. El LS está constituido por un alto contenido de glicosaminoglicanos que podrían proteger la membrana adosándose a ella a través de puentes de hidrógeno, impidiendo así la exposición de los lípidos al ataque oxidativo de los EROS.

Considerando este postulado se estudió la capacidad anti-lipoperoxidativa de glicosaminoglicanos como AH y CS. Para ambos se utilizaron dos concentraciones: 0,312 mg/mL y 0,625 mg/mL. Cabe señalar que para el caso del AH las concentraciones utilizadas fueron similares a las fisiológicas. Por otra parte, la concentración de CS utilizada en los ensayos fue muy superior al rango fisiológico del LS, y aún así no se observó efecto anti-lipoperoxidativo. Sin embargo, al mezclar cantidades iguales de CS y AH (0,312 mg/mL), esta mezcla inhibió en un 17% la lipoperoxidación microsómica (Figura 13). Se necesitan nuevos experimentos para explicar este fenómeno.

Con el propósito de comprobar si algún otro mecanismo antioxidante presente en el LS, pudiese explicar los resultados obtenidos; se evaluó la actividad GSH-T, que está representada por una familia de enzimas las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos, tanto en la fracción citosólica como unidas a membranas. Así, el 10% de la proteína total citosólica hepática y el 3% de la proteína total microsómica hepática corresponden a GSH-T (Letelier *et al.*, 2006). Esta enzima está

involucrada en el control de la acción fisiológica de los EROS, como también en la detoxificación de compuestos lipofílicos y altamente electrofílicos.

Los tres LS ensayados presentaron actividad GSH-T, actividad que representó aproximadamente el 10% de aquella presente en los microsomas hepáticos de rata para los LS provenientes de articulación normal y con daño crónico. Sin embargo, este porcentaje fue mayor, aproximadamente 12% en el LS proveniente de la articulación con membrana sinovial congestiva (Figura 14). Estos resultados sugieren que al menos uno de los mecanismos antioxidantes de la articulación es la GSH-T. Cabe señalar que la GSH-T se induce frente a estrés oxidativo (Letelier *et al.*, 2006; Ostalowska *et al.*, 2006) y esta podría ser la causa de la mayor actividad GSH-T en este último LS. Como una forma de evaluar si la actividad GSH-T se pudiese afectar por la adición de LS, se midió la actividad GSH-T de una mezcla formada por la fracción microsomal más cada uno de los LS analizados. Los resultados mostraron que la actividad GSH-T obtenida correspondió a la suma de las actividades de ambos componentes (Figura 14).

Considerando el papel de la GSH-T frente a estrés oxidativo, se estudió el efecto de los LS sobre la inhibición de la actividad GSH-T microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. La presencia de los tres LS en estudio disminuyó esta inhibición, efecto que fue mayor en presencia del LS de la articulación con membrana sinovial congestiva y menor para el LS normal (Figura 15). Esto indicaría que algún componente del LS, particularmente del obtenido de articulación con membrana sinovial congestiva, podría proteger la actividad GSH-T. Por otra parte, AH y CS protegieron la actividad GSH-T microsómica de la inhibición provocada por Fe^{3+} /ascorbato, contrario a lo observado en el ensayo lipoperoxidativo (Figura 16). Parece ser que las características estructurales de estos glicosaminoglicanos estarían involucradas en estos efectos; aunque ellos son compuestos polares, podrían adherirse a la membrana microsómica actuando como una barrera física, impidiendo así que las EROS alcancen las proteínas insertas en la membrana, mecanismo que podría explicar el efecto protector de la GSH-T observado.

Como se mencionó anteriormente, los grupos tiólicos de muchas proteínas son esenciales para el desarrollo de su actividad biológica. La GSH-T es una de estas proteínas y así, la alteración de sus grupos tiólicos (oxidación y/o alquilación) disminuye o anula su actividad catalítica (Letelier *et al.*, 2006). Dada la protección que los LS, como también AH y CS ejercieron sobre esta actividad enzimática microsómica, se estudió el efecto antioxidante de ellos sobre los tioles microsómicos sometidos al sistema Fe^{3+} /ascorbato. Cabe señalar que el LS proveniente de la articulación con membrana sinovial congestiva, el AH y CS protegieron los tioles microsómicos del efecto oxidativo inducido por Fe^{3+} /ascorbato; sin embargo, los LS normal y proveniente de articulación con daño crónico no previnieron el daño oxidativo a los tioles microsómicos (Figura 17). Fe^{3+} /ascorbato es un sistema oxidante inespecífico, por lo tanto oxida cualquier grupo tiólico, incluyendo los tioles presentes en la GSH-T microsómica y las presentes en los distintos LS. Se mencionó anteriormente que la tendencia a una mayor actividad GSH-T encontrada en el LS proveniente de la articulación con membrana sinovial congestiva, podría responder a un fenómeno de inducción enzimática durante el proceso patológico articular, ya que está descrito que esta enzima se induce frente a estrés oxidativo. Por lo tanto, se podría postular que este LS al proteger la actividad de GSH-T, esta enzima a su vez protegería a los grupos tioles totales al cumplir su papel antioxidante en este sistema experimental. Por otra parte, CS y AH protegieron los tioles microsómicos de la oxidación provocada por Fe^{3+} /ascorbato en similar extensión a este LS, efecto similar al observado frente a la inhibición oxidativa de la GSH-T microsómica. Al discutir anteriormente este fenómeno, se postuló una posible adhesión de los compuestos glicosaminoglicanos a la membrana microsómica como mecanismo responsable del efecto protector observado, el cual se reafirma con estos resultados.

Resumiendo, la GSH-T es al menos uno de los mecanismos antioxidantes presentes en la articulación metacarpo falángica equina. Más aún, la función de los glicosaminoglicanos presentes en el LS, no solamente ejercen una actividad lubricante en la articulación, sino además, dada su alta concentración en el LS, podrían adherirse a la membrana de las células que conforman las distintas estructuras articulares, provocando una protección tipo barrera física frente al estrés oxidativo. Este

mecanismo podría explicar la inhibición de la lipoperoxidación microsómica mostrada por los LS normal y con daño crónico, la cual fue independiente de la concentración de ellos en la mezcla de reacción. El menor efecto protector del LS proveniente de la articulación con membrana sinovial congestiva podría deberse al estrés oxidativo propio de la articulación patológica, que ha consumido equivalentes reductores y que además puede haber alterado en parte la estructura de los glicosaminoglicanos. Sin embargo, la ausencia de efecto protector de la lipoperoxidación al utilizar AH y CS, podría indicar que el efecto protector frente a la lipoperoxidación podría estar relacionado con un mecanismo diferente.

La presencia de agentes protectores de grupos tiólicos en el LS no ha sido descrita, pero de acuerdo a nuestros resultados el AH y el CS podrían ejercer dicha función, permitiendo conservar la actividad enzimática y así la integridad articular. Dado que estos son antecedentes preliminares que asocian la capacidad antioxidante de LS con la protección de sus componentes, se necesitan mayores estudios al respecto, preocupación actual de los laboratorios donde se realizó esta memoria de título.

CONCLUSIONES

1. El líquido sinovial proveniente de articulación normal y con daño crónico, inhibieron en forma significativa (40%) la lipoperoxidación microsómica sometida a estrés oxidativo por la mezcla Fe^{3+} /ascorbato; efecto que no fue dependiente de la concentración. Sin embargo, el líquido sinovial proveniente de articulación con membrana sinovial congestiva la inhibió pobremente (16%) y sólo a la mayor concentración de los LS estudiada (100 μ L). El ácido hialurónico y el condroitín-6-sulfato no fueron capaces de inhibir la lipoperoxidación microsómica.
2. Los tres líquidos sinoviales presentaron actividad glutatión-transferasa (GSH-T), sin embargo la mayor actividad se encontró en el líquido sinovial proveniente de articulación con membrana sinovial congestiva. La presencia de los líquidos sinoviales, de ácido hialurónico y condroitín-sulfato, previno el daño oxidativo sobre la GSH-T microsómica inducido por Fe^{+3} /ascorbato.
3. El líquido sinovial proveniente de articulación con membrana sinovial congestiva, el ácido hialurónico y el condroitín-6-sulfato, protegieron a los tioles microsómicos sometido a estrés oxidativo, efecto que no se detectó al utilizar líquido sinovial proveniente de articulación normal y con daño crónico.

Corolario. La significancia fisiológica de estos datos relacionada con la protección de la articulación en procesos asociados al estrés oxidativo, como la osteoartritis, indica que la capacidad antioxidante del líquido sinovial es todavía un campo abierto para futuras investigaciones.

ABREVIATURAS

1- Cl-2,4-DNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
AH	ácido Hialurónico
CS	condroitín-sulfato
EDA	enfermedad degenerativa articular
DTNB	ácido-5,5'-ditiobis- 2-nitrobenzoico
GAGs	glicosaminoglicanos
GSH	glutación reducido (γ -glu-cys-gly)
GSH-T	glutación S-transferasa
LS	líquido sinovial
LSs	líquidos sinoviales
LS-N	líquido sinovial de articulación normal
LS-DC	líquido sinovial de articulación con daño crónico
LS-MSC	líquido sinovial de articulación con membrana sinovial congestiva
MEC	matriz extracelular
MS	membrana sinovial
MDA	malondialdehído
PG	proteoglicanos
TBA	ácido-2-tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido- tricloroacético
TNB	uridín difosfoglucuronil transferasa

BIBLIOGRAFÍA

1. ADARMES, H.; CROXATTO, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZALEZ, E. 2006. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehídos y proteínas en el líquido sinovial de la articulación metacarpo falángica equina normal y alterada. *Arch. Med. Vet.* 38(1): 47-52.
2. AUER, D.; NG, J. SEAWRIGHT, A. 1993. Free radical oxidation in plasma and synovial fluid of horses with synovial inflammation. *Aust. Vet. J.* 70: 49-52.
3. ALFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutase: Role in joint disease. *Joint Bone Spine.* 74: 324-329.
4. BALOGH, G.; ILLES, J.; SZEKELY, Z.; FORRAI, E.; GERE, A. 2003. Effect of different metal ions on the oxidative damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 410: 76-82.
5. CAMPO, G.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A.; ALTAVILLA, D.; MICALI, C.; CALATRONI, A. 2003a. Aromatic trap analysis of free radicals production in experimental collagen-induced arthritis in the rat: protective effect of glycosaminoglycans treatment. *Free. Radic. Res.* 37(3): 257-268.
6. CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A. 2003b. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res. Ther.* 5(3): 122-131.
7. CAMPO, G.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ASCOLA, A.; FERLAZZO, A.; CALATRONI, A. 2004. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chem. Biol. Interact.* 148: 125-138.
8. DECHANT, J.E.; BAXTER, G.M.; FRISBIE, D.D.; TROTTER, G.W.; McILWRAITH, C.W. 2005. Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism. *Equine Vet. J.* 37: 227-231.

9. DIMOCK, A.N.; SICILIANO, P.D.; McILWRAITH, C.W. 2000. Evidence supporting an increase presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. *Equine Vet. J.* 32(5): 439-443.
10. GETTY, R. 1982. Sindesmología General (Artrología). En *Anatomía de los Animales Domésticos*. Sisson, S.; Grossman, J.D. Salvat Editores S.A. 5ª Ed. Barcelona, España. Pp. 42-44.
11. GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse –A review. *Vet. J.* 171: 51-69.
12. GRAPHPAD PRISMA 5 DEMO (2007)
13. HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B.1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
14. HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88.
15. HENROTIN, Y.E.; BRUCKNER, P.; PUJOL, J. P. L. 2003. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 11(10): 747-755.
16. HENROTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. 2005. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthr. Cartil.* 13: 643-654.
17. HOWARD, R.D.; MCILWRAITH C.1996. Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. En McIlwraith, C.W., Trotter G.W. *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 257 - 269.
18. JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. 1991. Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and role in Physiological Processes. *Physiol. Rev.* 71: 481-539.
19. KETTERER, B.; CHRITODOULIDES, L. 1969. Two specific azodye carcinoge binding proteins of the rat liver: the identity of aminoacid residues which bind the azodye. *Chem. Biol. Interact.* 1: 173-183.
20. KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. 2007. The oxidant/ antioxidant equilibrium in horses. *Vet. J.* 177: 178-191.

21. LETELIER, M.E.; PIMENTEL, A; PINO, P.; LEPE, A.M.; FAUNDEZ, M.; ARACENA, P.; SPEISKY, H. 2005. Microsomal UDP-Glucuronyltransferase in Rat Liver: Oxidative Activation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96: 480–486.
22. LETELIER, M.E.; MARTINEZ, M.; GONZALEZ, V.; FAUNDEZ, M.; ARACENA, P. 2006. Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chem. Biol. Interact.* 164: 39-48.
23. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-675.
24. LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173: 502-511.
25. MCILWRAITH C. 1996. General Pathobiology of the joint and response to injury. En Mcllwraith, C.W., Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 40 - 70.
26. MILNER, P.I.; FAIRFAX, T.P.A.; BROWING, J.A.; WILKINS, R.J.; GIBSON, J.S. 2006. The effect of O₂ tension on pH homeostasis in equine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 54: 3523-3532.
27. MOSIALOU, E.; MORGENSTERN, R. 1989. Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (1): 289–294.
28. NELSON, R. W.; COUTO, C. G. 2003. Small Animal Internal Medicine. 3^a Ed. Mosby. Missouri. 1079p.
29. OSTALOWSKA, A.; BIRKNER, E.; WIECHA, M.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; KAPOLKA, D.; ZON-GIEBEL, A. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthr. Cartil.* 14: 139-145.
30. POOL, R.R. 1996. Pathologic manifestations of joint disease in the athletic horse. En Mcllwraith, C.W., Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 87-104.
31. RAY, C.S.; POOLE, A.R.; MCILWRAITH, C.W. 1996. Use of synovial fluid and serum markers in articular disease. En Mcllwraith, C.W., Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 203-216.

32. SORG, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C.R. Biol.* 327: 649-662.
33. TODHUNTER, R.J. 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. En McIlwraith, C.W., Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 1-28.
34. TROTTER, G.W.; MCILWRAITH, C.W. 1996. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. En McIlwraith, C.W., Trotter G.W. Joint disease in the horse. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 120-145.
35. TSUJI, G.; KOSHIBA, M.; NAKAMURA, N.; KOSAKA, H.; HATACHI, S.; KURIMOTO, C.; KUROSAKA, M.; HAYASHI, Y.; YODOI, J.; KUMAGAI, S. 2006. Thioredoxin protects against joint destruction in a murine arthritis model. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1721-1731.
36. VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
37. VILLASANTE, A. 2006. Determinación de la capacidad antioxidante y del daño oxidativo en el líquido sinovial de la articulación metacarpo falángica equina macroscópicamente sana y con daño crónico. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 57 p.