



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

**Determinación de Nitración de Proteínas en Tirosina en Membrana  
Sinovial de Articulación Metacarpofalángica de Equino como Posible  
Marcador de Osteoartritis en Etapa Inicial**

**Claudia Viviana Rojas de la Fuente**

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

PROFESOR GUÍA: Marco A. Galleguillos  
Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE  
2015

## ÍNDICE

Resumen	iii
Abstract	iv
Introducción	v
Revisión bibliográfica	
Osteoartritis	1
Estructura articular: membrana sinovial	2
Estructura articular: cartílago	2
Metabolitos involucrados en osteoartritis: importancia del óxido nítrico	5
Rol del óxido nítrico en la articulación	6
Nitración de proteínas en tirosina	6
Objetivos	
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Material y métodos	
Obtención de muestras	10
Caracterización macroscópica de las muestras	10
Obtención de cartílago articular	10
Obtención de membrana sinovial	11
Recuento de células nucleadas	11
Clasificación de las muestras	11
Análisis histológico del cartílago articular	11
Determinación de proteínas	12
Homogeneización de membrana sinovial	12
Detección de proteínas nitradas en residuos de tirosina de membrana sinovial mediante “western blot”	12
Control del primer anticuerpo	13
Control del segundo anticuerpo	14
Densitometría	14

Análisis de datos	14
Resultados	
Análisis histológico	15
“Western blot” de membrana sinovial	16
Control segundo anticuerpo	17
Control primer anticuerpo	18
Discusión	22
Conclusión	26
Bibliografía	27
Tablas y figuras	
Tabla N°1	4
Tabla N°2	15
Tabla N°3	15
Tabla N°4	17
Tabla N°5	17
Tabla N°6	20
Figura N°1	16
Figura N°2	18
Figura N°3	19
Figura N°4	19
Figura N°5	21

## RESUMEN

La nitración de proteínas en tirosina *in vivo* es reconocida como un marcador de estrés oxidativo. Se ha asociado un aumento en su concentración con diversas patologías tales como alzheimer, isquemia, enfermedad obstructiva pulmonar crónica, artritis reumatoide, osteoartritis, entre otras. Con el objetivo de describir el comportamiento de la nitración de proteínas en tirosina en articulación metacarpofalángica equina con un grado leve de osteoartritis (OA), se sometieron a “western blot” homogeneizados de membrana sinovial de equino *postmortem* para detectar 3-nitrotirosina (3-NT). Se clasificaron las muestras en dos grupos de 10 articulaciones de acuerdo al recuento de células nucleadas (RCN) presentes en el líquido sinovial: grupo **A**, con un RCN menor a 1.000 células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial y; grupo **B**, con un RCN igual o mayor a 1.000 células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial. Se realizó un análisis histológico del cartílago articular de ambos grupos, encontrándose una mayor cantidad de grupos isógenos en el grupo **B**. Por lo tanto, este grupo se encontraba en una etapa inicial de OA.

En el “western blot” se observó una reacción inespecífica del anticuerpo secundario con albúmina de equino. Sin embargo, al incubar con los anticuerpos primario y secundario se encontró una mayor intensidad en esta banda. No se detectó la presencia de otras proteínas nitradas en ambos grupos.

Como control positivo se usó líquido sinovial proveniente de una articulación metacarpofalángica con un cuadro séptico. Una parte de este líquido sinovial fue sometido a estrés nitrosativo *in vitro* con peroxinitrito y la otra fue utilizada como control. En ambas muestras se detectaron bandas proteicas nitradas en tirosina pero se observó una mayor intensidad en la muestra tratada con peroxinitrito.

En conclusión, no hay diferencia en el grado de 3-NT de membranas sinoviales provenientes de articulación metacarpofalángica equina normal y con OA temprana.

Palabras clave: membrana sinovial, osteoartritis, estrés nitrosativo, 3-nitrotirosina

## ABSTRACT

Protein tyrosine nitration is a recognized marker of oxidative damage in tissues. Increased levels have been associated with many pathological processes such as Alzheimer disease, ischemia, Chronic obstructive pulmonary disease, Rheumatoid arthritis and Osteoarthritis (OA).

To characterize the formation of tyrosine nitrated proteins found in metacarpophalangeal joints in horses with low grade of OA, equine synovial membranes collected *post mortem* were analyzed, using western blot to detect and quantify 3-nitrotyrosine (3-NT).

Samples were classified into two groups, according to the total nucleated cell counts (TNCC): group (A) with TNCC of less than 1000 cell/ $\mu$ L of synovial fluid and group (B) with TNCC higher than 1000 cell/ $\mu$ L of synovial fluid. The samples of articular cartilage were analyzed using standard histological procedures to characterize the degree of compromise of the corresponding articulation, allowing us to find a relationship between count cluster and TNCC.

There was an unspecific reaction between second antibody and equine proteins

No statistically significant differences of nitrated protein were found between these groups. However, we detected basal nitration of one protein, likely albumin in all samples.

A positive control was performed using synovial fluid from a metacarpophalangeal joint with a septic condition, again the sample was divided into two. The first was submitted to nitrosative stress *in vitro*, which was induced with peroxynitrite; the second sample was left without any stress treatment. In both samples, we detected the nitrated protein nitrotyrosine (3-NT). However, in the stress sample induced with peroxynitrite two bands of nitrotyrosine were observed, which were not present in the sample left without any stress treatment.

In conclusion, there is no difference in the degree of 3-NT synovial membranes from normal equine metacarpophalangeal joint and early OA.

Keywords: synovial membrane, osteoarthritis, nitrosative stress, 3-nitrotyrosine

## INTRODUCCIÓN

La Osteoartritis (OA) se define como una patología inflamatoria de progreso lento que afecta a los tejidos articulares causando degradación de cartílago articular, inflamación sinovial y alteración del hueso subcondral (Rousseau y Garnero, 2012). Es de etiología multifactorial pudiendo encontrarse un aumento en la carga de peso que debe soportar la articulación o alteraciones genéticas de los componentes de la matriz cartilaginosa que causan una fragilidad en el tejido (Berenbaum, 2013).

Esta afección constituye una de las principales causas de pérdida en el rendimiento del equino debido a que se constituye en una enfermedad que merma el rendimiento deportivo y acorta la vida útil del animal en cualquier tipo de disciplina deportiva, ya sea equitación, rodeo o hípica.

Actualmente, en el ámbito clínico, la única herramienta con la que se cuenta para diagnosticar esta enfermedad es mediante estudio radiográfico. Sin embargo, aún existen limitaciones en esta técnica que impiden detectar alteraciones asociadas a una OA temprana, ya que esta comienza mucho antes de que se presente la signología clínica.

Es por esto que en los últimos años las investigaciones se han centrado en la búsqueda de marcadores biológicos de OA que permitan un diagnóstico precoz de la enfermedad con el fin de tratar a tiempo la articulación y limitar así el daño sufrido en ésta.

El óxido nítrico, en ciertas condiciones como en procesos inflamatorios, participa en la nitración de proteínas en tirosina formando 3-nitrotirosina, la que se constituye en un reflejo de estrés nitrosativo y en uno de los posibles marcadores de OA temprana. Esta reacción ocurre en condiciones fisiológicas en el organismo y en condiciones pro-inflamatorias se ve exacerbada pudiendo aumentar hasta 1000 veces (Caron, 2011).

En la presente memoria de título se abordará la detección de 3-nitrotirosina como posible marcador biológico para la osteoartritis temprana en articulación metacarpofalángica de equino.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Osteoartritis

La osteoartritis (OA), caracterizada como una enfermedad degenerativa articular, es una de las principales causas de cojera en equinos de deporte. Una de las alteraciones que caracteriza la patología es la pérdida de cartílago articular, cuyo metabolismo depende de los condrocitos. Estas células, presentes en muy baja cantidad en el cartílago, constituyen el único grupo celular del tejido y tienen por función mantener la homeostasis del cartílago articular, sintetizando la matriz extracelular incluyendo proteoglicanos y colágeno, además de expresar proteínas como las metaloproteinasas encargadas de su degradación. Poseen una baja actividad metabólica y son incapaces de regenerar el cartílago una vez sufrida una injuria, respondiendo con una respuesta inflamatoria no habitual debido a que es un tejido no vascularizado y no innervado (Berenbaum, 2013).

La importancia del cartílago articular radica en sus funciones biomecánicas y de protección articular. Posee una gran capacidad elástica de deformación siendo capaz de soportar considerable estrés compresivo. Esta resistencia a la compresión está dada por interacciones entre el colágeno, proteoglicanos y su alto contenido de agua de alrededor del 70% (Caron, 2011).

En condiciones fisiológicas existe un balance óptimo entre los procesos catabólicos y anabólicos del cartílago, sin embargo, en condiciones patológicas –como es el caso de la OA- diversos factores pro-inflamatorios como citoquinas y NO (óxido nítrico) generan un desbalance en estos procesos lo que resulta en una pérdida de la integridad articular (Frisbie, 2011).

Uno de los primeros eventos que ocurren frente a un daño articular es la infiltración de células nucleadas en el líquido sinovial (LS). Caron (2011) describe que una articulación normal posee un recuento de células nucleadas (RCN) de 50 a 500 células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial, mientras que una articulación con OA posee un  $\text{RCN} \leq 1.000$  células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial. Lemaitre (2010) realizó un estudio donde comparó la correlación existente entre el grado de compromiso articular y el RCN, encontrando que el grupo con un RCN promedio de 1.000 células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial presentaba un mayor grado de compromiso articular *versus* el grupo con RCN promedio de 95 células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial.

De acuerdo a estos estudios y al realizado por Steel (2008), en la presente memoria de título se considerará una articulación normal con un RCN totales inferior a 1.000 células por  $\mu\text{L}$  de líquido sinovial.

### **Estructura articular: membrana sinovial**

La membrana sinovial (MS), también denominada sinovia, es un tejido que se encuentra recubriendo la cavidad articular y está compuesta por dos capas celulares (Frisbie, 2006):

1. Íntima: carece de membrana basal y está formada por dos a cuatro capas celulares. Determina la composición del LS. Posee dos tipos de poblaciones celulares, diferenciadas en base a su ultraestructura y características inmunohistológicas: sinoviocitos tipo A y B, los cuales cumplen un rol de fagocitosis y de secreción respectivamente.
2. Subíntima: compuesta de tejido fibroso, areolar y adiposo. Es un tejido ricamente irrigado e inervado por nervios periféricos y ramas de nervios musculares

A su vez, los sinoviocitos están encargados de secretar una gran variedad de proteínas que participan en procesos anabólicos y catabólicos de la articulación como hialuronan, colágeno, lubricina, prometaloproteinasas de matriz (pro-MMP), interleuquinas y eicosanoides (Frisbie, 2006). El hialuronan y la lubricina participan en la exclusión estérica de moléculas de mayor tamaño en la articulación, regulando de esta manera la composición del LS y la lubricación de la cavidad sinovial (Frisbie, 2006).

La MS cumple un rol importante en la composición del LS, así como también lo definen el grado de drenaje linfático e inflamación presente en la articulación. Sólo permite el paso de moléculas desde el torrente sanguíneo con un tamaño inferior a 10 kDa como glucosa, oxígeno y algunas proteínas (Frisbie, 2006).

### **Estructura articular: cartílago**

Corresponde a la estructura central de la articulación y junto con el LS permiten que los movimientos articulares ocurran con un grado mínimo de fricción (Frisbie, 2006). Esta estructura es la que clínicamente se utiliza para clasificar una articulación.

Su baja capacidad de regeneración determina un mal pronóstico de las afecciones articulares. Esta baja capacidad está determinada por el extenso periodo de tiempo que

requieren sus componentes para reemplazarse, donde los proteoglicanos requieren alrededor de 300-1800 días para su recambio, y el colágeno 120-350 años, dependiendo de la especie (Van Weeren *et al*, 2008).

Es de color blanco, pero en ciertas regiones es posible apreciar una coloración ligeramente rosada debido a las capas subyacentes de hueso subcondral. Su grosor es de uno a cuatro milímetros, lo que varía según las fuerzas biomecánicas que influyen en cada articulación. Carece de inervación e irrigación por lo que su nutrición y eliminación de residuos se realiza a través del LS. El cartílago está compuesto por condrocitos y matriz extracelular; los primeros constituyen aproximadamente el 1 a 12% del volumen del cartílago, mientras que la matriz extracelular está compuesta por agua, proteoglicanos y colágeno. En base seca, la matriz extracelular se compone de un 50% de colágeno, 35% de proteoglicanos hidrofílicos de los cuales el más importante es el agregan, 10% de glicoproteínas, 3% de minerales, 1% de lípidos y 1% de otras sustancias (Frisbie, 2006; Van Weeren *et al*, 2008).

La composición bioquímica del cartílago difiere en distintas zonas del mismo, estando determinada por las fuerzas biomecánicas generadas en distintos puntos del cartílago durante la locomoción (Van Weeren *et al*, 2008). Esta heterogeneidad se desarrolla durante los primeros seis meses de vida del equino, no pudiendo compensarse a futuro (Van Weeren *et al*, 2008).

La articulación metacarpofalángica es la articulación con mayor incidencia de osteoartritis, donde las superficies articulares de los huesos tercer metacarpiano y primera falange se encuentran en estrecho contacto y separados por cartílago articular de 1 mm de espesor (McIlwraith *et al*, 2010). Lesiones asociadas a osteoartritis incluyen erosiones y líneas de desgaste en el cartílago, las cuales causan una sustitución de la superficie del cartílago por capas de tejido conectivo, cuadro que finalmente causa una esclerosis del hueso subcondral y focos de osteonecrosis.

McIlwraith (2010) estableció criterios de clasificación histológica de la articulación, basándose en lo descrito anteriormente por Mankin *et al* (1971). Esta clasificación se puede observar en la tabla 1.

**Tabla Nro. 1:** Clasificación histológica de la articulación equina, basándose en: a) necrosis de condrocitos representados por lagunas vacías en la muestra; b) grupos isógenos que representan proliferación y regeneración del cartílago; c) fibrilación superficial que da cuenta de daño en la capa más superficial del cartílago y d) pérdida focal de células.

<b>Grado</b>	<b>Necrosis condrocitos</b>	<b>Grupos isógenos</b>	<b>Fibrilación superficial</b>	<b>Pérdida focal de células</b>
Grado 0	Sección sin necrosis	Sección sin grupos isógenos	Sin fibrilación en la superficie del cartílago articular	Normalidad de población celular en sección
Grado 1	Máximo una célula necrótica cercana a la superficie articular en campo de 20x	Dos condrocitos en la misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación del cartílago restringida a la superficie y capa superficial	10 a 20% de área sin células en campo de 20x
Grado 2	Una a dos células necróticas cercanas a la superficie articular en campo de 20x	Dos a tres condrocitos en una misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación que se extiende hasta la zona media del cartílago articular	20 a 30% de área sin células en campo de 20x
Grado 3	Dos a tres células necróticas cercanas a la superficie articular en campo de 20x	Tres a cuatro condrocitos en una misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación que se extiende hasta el comienzo de la zona profunda del cartílago articular	40 a 50% de área sin células en campo de 20x
Grado 4	Tres a cuatro células necróticas cercanas a la superficie articular en campo de 20x	Más de cuatro condrocitos en una misma laguna en aspecto superficial de cartílago articular	Fibrilación que involucra la zona profunda del cartílago articular	Área mayor al 50% sin células en un campo de 20x

## **Metabolitos involucrados en osteoartritis, importancia del óxido nítrico**

El óxido nítrico es una molécula con efectos pleiotrópicos que varía su acción dependiendo del microambiente local (Feelisch, 2008). Actúa como modulador intercelular y regulador del flujo sanguíneo, actividad neural, desarrollo y diferenciación de condrocitos, entre otras funciones (Abramson, 2008a). Se forma como producto de la oxidación de L-arginina generando citrulina (Radi, 2013), proceso catalizado por las isoenzimas óxido nítrico sintasas (NOS). Existen tres isoformas de NO: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) (Abramson, 2008b). Las dos primeras, también denominadas isoformas constitutivas, son dependientes de calcio y producen baja cantidad de NO. Por otro lado, la iNOS es independiente de calcio y su expresión es inducida por citoquinas proinflamatorias (Abramson, 2008b), teniendo la capacidad de generar una mayor cantidad de NO (Yeo *et al*, 2008).

En 1994 Taskiran *et al* (citado por Abramson, 2008a) observaron que el NO inhibe la síntesis de proteoglicanos y colágeno en cultivos de cartílago de conejo. Por otra parte, el NO regula la activación de las metaloproteinasas (MMP), reacción dependiente de cGMP (Abramson, 2008a). Estas reacciones en su conjunto contribuyen a la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular.

El NO reacciona con el anión superóxido ( $O_2^-$ ) para formar anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). El anión superóxido es generado por una gran variedad de reacciones biológicas incluyendo la respiración celular y por células como macrófagos y neutrófilos activados, condrocitos y sinoviocitos (Abello *et al*, 2009; Verwilghen *et al*, 2009). Los polimorfonucleares (PMN) que contienen mieloperoxidasa generan NO y  $O_2^-$  formando  $ONOO^-$  (Hrabárová *et al*, 2007).

A su vez, el anión peroxinitrito es una molécula reactiva capaz de modificar biomoléculas como lípidos, DNA, proteínas y glicosaminoglicanos (Abello *et al*, 2009). Traspasa membranas biológicas por difusión pasiva en su forma desprotonada y a través de canales aniónicos (Hrabárová *et al*, 2007). Reacciona directamente con los aminoácidos cisteína, metionina y triptófano, a diferencia de su reacción con tirosina, fenilalanina e histidina la que es realizada por especies secundarias intermediarias (Abello *et al*, 2009).

En el caso de la tirosina (Tyr) causa su nitración a 3-nitrotirosina. Esta reacción ocurre en condiciones fisiológicas en niveles basales, y aumenta considerablemente bajo

condiciones que causan aumento de NO, por ejemplo, en inflamación (Abello *et al*, 2009).

En un estudio realizado por Tohgi *et al* (citado por Syslova *et al*, 2014) en pacientes humanos con Alzheimer, se encontró una concentración de 3-NT en líquido cefalorraquídeo de  $11,4 \pm 5,4$ nM, *versus* el grupo control de pacientes sanos con una concentración de 3-NT de  $1,6 \pm 0,4$  nM. En otro estudio realizado por Misko *et al* (2013) se evidenció un aumento en la concentración de nitrotirosina tanto en LS como en plasma en pacientes humanos con osteoartritis.

Así, la detección de proteínas que han sufrido nitrotirosinación se constituye en un reflejo del estrés oxidativo sufrido por un tejido en condiciones patológicas (Radi, 2013).

### **Rol del óxido nítrico en la articulación**

La enzima iNOS es sobreexpresada en condrocitos de articulaciones con osteoartritis, perpetuando así la liberación de citoquinas inflamatorias que desencadenan procesos catabólicos del cartílago. Esta sobreexpresión ocurre principalmente en la zona superficial del cartílago y responde a factores biomecánicos y bioquímicos (Vuolteenaho *et al*, 2007).

Una elevada concentración de la enzima iNOS se asocia con un aumento de la apoptosis de condrocitos, aumento en la actividad de las MMP y disminución de la síntesis de matriz del cartílago articular (Misko *et al*, 2013). El NO derivado de células endoteliales puede degradar heparin y heparan sulfato por la vía del ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) más rápido que por la vía del  $\text{ONOO}^-$  (Hrábarová *et al*, 2007).

### **Nitración de Proteínas en Tirosina**

La nitración en tirosina es una modificación covalente que resulta de la adición de un grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ) en la posición orto respecto del hidroxilo fenólico (Abello *et al*, 2009). Con esto -a pH fisiológico- se introduce una carga negativa que altera la estructura y función proteica, además de alterar la fosforilación de la tirosina (Yeo *et al*, 2008). Radi (2013) describe este proceso como reversible, y favorecido sobre la dimerización de la tirosina, pudiendo ocurrir ambos procesos simultáneamente.

La producción de peroxinitrito está controlada por la difusión de NO y  $\text{O}_2^-$ . En condiciones fisiológicas, la reacción de NO y  $\text{O}_2^-$  ocurre con mayor velocidad que la

reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) sobre  $O_2^-$  (Yeo *et al*, 2008). Es así como en condiciones inflamatorias con un aumento en la producción de NO y  $O_2^-$  habrá un aumento en la producción de peroxinitrito.

El peroxinitrito es una molécula de vida media muy corta (menos de 10 ms *in vivo*), el cual puede causar daño celular por su reacción con varias sustancias químicas, incluyendo centros metálicos y  $CO_2$  (Yeo *et al*, 2008). Si bien el peroxinitrito no puede reaccionar directamente con los residuos de tirosina, puede producir especies oxidantes y nitrantes, incluyendo el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ). El radical resultante de esta reacción remueve el hidrógeno (H) desde el grupo hidroxilo de los residuos de tirosina, promoviendo la formación del radical tirosil, el que luego reaccionará con dióxido de nitrógeno para formar 3-NT (Yeo *et al*, 2008).

Esta nitración que ocurre post-traducción implica una modificación en la función proteica debido a que cambia el pKa de la tirosina de 10-10,3 a 7,2-7,5 modificando así el punto isoelectrónico de la proteína (Syslová *et al*, 2014). El grupo nitro es un sustituyente voluminoso, pudiendo generar restricciones estéricas a la proteína. Sin embargo, solo un limitado grupo de proteínas sufren nitración, y de éstas solo una baja cantidad de residuos de tirosina son nitrados (Syslová *et al*, 2014).

En condiciones fisiológicas la nitración de los grupos tioles se encuentra favorecida sobre la nitración de la tirosina, pero en condiciones patológicas se modifica la reactividad del peroxinitrito hacia la nitración de tirosina (Abello *et al*, 2009).

Sin embargo, la reacción con peroxinitrito no es la única vía para la nitración de la tirosina, pudiendo ocurrir también por:

1. Oxidación de nitrito: El nitrito ( $NO_2^-$ ) es un producto primario de la auto-oxidación del NO, y por acción de peroxidases como la mieloperoxidasa y eosinofil-peroxidasa -presentes en altas cantidades en leucocitos activados- sufre una nueva oxidación generando  $NO_2$ , el cual se constituye en una especie nitrante actuando sobre los residuos de tirosina para formar 3-NT en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Yeo *et al*, 2008).
2. Reacción de Tyr con NO: deriva en la formación de 3-nitrosotirosina, compuesto que puede ser nuevamente oxidado por la vía del radical iminoxil a 3-NT. Esta reacción se ha observado en proteínas que poseen un centro metálico, como en la prostaglandina endoperoxidasa sintasa (Souza *et al*, 2008).

La nitración de proteínas es un proceso selectivo, sin embargo, no está completamente esclarecido el patrón de ocurrencia. Se ha visto ciertas características comunes de las proteínas que sufren nitro-tirosinación (Souza *et al*, 2008):

- a) Presencia de uno o más residuos ácidos como glutamato y aspartato próximos al residuo de Tyr nitrado
- b) Baja cantidad de residuos de cisteína y metionina próximos al residuo de Tyr nitrado
- c) Presencia de aminoácidos como prolina y glicina

Al ocurrir la nitración en tirosina, la función proteica se altera pudiendo: 1) exacerbarse, por ejemplo el citocromo c aumenta su actividad de peroxidación y el fibrinógeno aumenta su agregación durante la coagulación; 2) disminuir como ocurre con las enzimas manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y prostaglandina I<sub>2</sub> sintasa (PGI<sub>2</sub>). También es posible que no experimente cambios en su función (Souza *et al*, 2008; Syslová *et al*, 2014).

Con el fin de describir el comportamiento de la nitrotirosina en el organismo, Nemirovskiy *et al* (2008) estimuló la formación de 3-NT administrando lipopolisacáridos bacterianos vía intraperitoneal en ratones, para posteriormente medir los niveles de 3-NT libres en plasma observándose un aumento significativo en los niveles de 3-NT totales, alcanzando el peak máximo de concentración 16 horas post inoculación, y retornando a niveles basales a las 96 horas post inoculación.

Debido a que no existen antecedentes que cuantifiquen claramente la diferencia existente entre la nitración de proteínas en tirosina en articulaciones con OA en etapa inicial y articulaciones sanas es que el presente trabajo pretende detectar la presencia de 3-NT en ambos casos, para establecer un patrón de comportamiento de este tipo de nitración.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de proteínas que han sufrido nitrotirosinación en membrana sinovial de articulaciones metacarpofalángicas de equino normal con diferentes recuentos de células nucleadas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Detectar la presencia de proteínas nitro-tirosinadas en membrana sinovial de articulación metacarpofalángica normal con diferentes recuentos de células nucleadas totales.
2. Comparar la intensidad de las bandas correspondientes a proteínas nitro-tirosinadas en membrana sinovial provenientes de articulaciones metacarpofalángicas equina normal con diferentes recuentos de células nucleadas totales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de muestras**

Se utilizaron articulaciones metacarpofalángicas, que fueron obtenidas de animales beneficiados en el Matadero Municipal de La Pintana. En este recinto se procedió a clasificar las articulaciones según características macroscópicas y a la obtención de las muestras requeridas.

En primera instancia, se retiró la piel que recubre la articulación metacarpofalángica y se procedió a lavar la zona con alcohol yodado, con el fin de disminuir las posibilidades de contaminación de las muestras obtenidas. A continuación y mediante punción con aguja de 21G y jeringa de 5 mL se obtuvo LS para luego proceder a realizar una disección completa de la articulación con el fin de exponer el cartílago articular y la membrana sinovial, y así proceder a la caracterización macroscópica de la articulación. Este LS se mantuvo en un baño de hielo en condiciones de refrigeración.

### **Caracterización macroscópica de las muestras**

Las muestras a utilizar en el estudio cumplieron con los siguientes requisitos de selección:

1. Líquido sinovial de coloración amarilla, sin presencia de detritus y aspecto no sanguinolento.
2. Cartílago articular de coloración blanco nacarado sin daños observables macroscópicamente como líneas de roce o focos de erosión.
3. Membrana sinovial no congestiva.

Se descartó toda muestra con alteración macroscópica de líquido sinovial y/o cartílago articular y/o membrana sinovial.

### **Obtención de cartílago articular**

Luego se procedió a obtener una muestra de cartílago articular mediante cortes superficiales con bisturí de los cóndilos medial y lateral del hueso tercer metacarpo. Estas muestras fueron conservadas en un recipiente con formalina al 10% para su posterior análisis histológico.

### **Obtención de membrana sinovial**

Las muestras de membrana sinovial fueron obtenidas de la región palmar de la articulación metacarpofalángica y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

### **Recuento de células nucleadas**

Se obtuvo una alícuota de 200 µL de LS realizando una dilución con cloruro de sodio 0,9% en una relación de 1:10 para realizar el RCN totales en una cámara de Neubauer.

El LS restante se centrifugó a 4000 x g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. Se descartó toda muestra que presentó sedimento rojo a la centrifugación con el objetivo de descartar articulaciones con daño avanzado y evitar interferencias ante la presencia de derrame articular causados por la punción articular.

### **Clasificación de las muestras**

De acuerdo al resultado obtenido de RCN totales en LS, las muestras se clasificaron en dos grupos: Grupo A) RCN totales inferior a 1000 células nucleadas por µL de LS (n=10); y Grupo B) RCN totales igual o mayor a 1000 células nucleadas por µL de LS (n=10).

### **Análisis histológico de cartílago articular**

Las muestras de cartílago articular, previamente fijadas en formalina 10%, fueron deshidratadas en un procesador automático de tejidos con alcoholes en concentraciones crecientes. Posteriormente, se incluyeron en bloques de parafina para luego seccionarlas con un micrótopo. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

Las placas histológicas fueron digitalizadas mediante el programa “Motic MC Camera”, y analizadas a través del programa computacional “ImageJ”

La evaluación histológica se realizó según lo descrito por Lemaitre (2010), Pease (2012) y An *et al* (2003). De cada muestra se describió:

1. Recuento de condrocitos por mm<sup>2</sup>
2. Recuento de grupos isógenos por mm<sup>2</sup>
3. Recuento de lagunas por mm<sup>2</sup>

## **Determinación de Proteínas**

Se determinó la concentración de proteínas en el LS mediante el método de Lowry *et al* (1951). Para realizar la curva de calibración se utilizó como patrón la albúmina sérica bovina en un rango de 5-50 µg de proteína.

Previamente las muestras fueron diluidas con agua destilada en una relación 1:10.

## **Homogeneización de membrana sinovial**

Cada muestra fue lavada con suero NaCl 0,9% y luego pesada. A continuación, se adicionó una solución en una proporción 1:4, que contenía Tris-HCl 50mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, ditioneitol (DTT) 0,5 mM, inhibidores de proteasas (PMSF 1 µM, Leupeptin 2 µM y Pepstatin 1 µM) y 2-β-mercaptoetanol 12 mM. Cabe destacar que durante todo el proceso la muestra se mantuvo sumergida en un baño de hielo.

La homogeneización se realizó con un disruptor de tejido a 13.000 rpm, tres veces durante 20 segundos cada una. Luego se procedió a centrifugar las muestras en una centrífuga refrigerada a 4°C y a 1000 x g durante quince minutos. De este paso se obtuvo el sobrenadante u homogeneizado el que fue almacenado a -20°C.

## **Detección de proteínas nitradas en residuos de tirosina de membrana sinovial mediante “western blot”**

Para la detección de proteínas nitradas en residuos de Tyr se utilizó un primer anticuerpo monoclonal de ratón contra 3-nitrotirosina (Nitrotyrosine 2A12:sc-65384) , y un segundo anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005) .

Los homogeneizados de membrana sinovial fueron cargados en una solución tampón que contenía Tris-HCl 33 mM pH 6,8, SDS al 10%, glicerol al 1%, azul de bromofenol al 0,005% y β-mercaptoetanol 700 mM. Todo esto en una relación 3:1. Luego las muestras fueron sometidas a calentamiento en baño maría a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes.

La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida 10% a voltaje constante de 90 volts. Se obtuvieron dos geles con diez muestras cada uno, donde se cargó una concentración constante de proteína de 10 µg en cada compartimento.

Luego, las proteínas presentes en los geles fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante una electrotransferencia a 0,4 amperes durante 120 minutos. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas a 4°C durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) en una solución TBS-leche con el objetivo de evitar una interacción inespecífica de los anticuerpos.

Posteriormente las membranas fueron sometidas a tres lavados con solución TBS-tween 20, diez minutos cada uno, para luego ser incubadas con el primer anticuerpo anti-nitrotirosina durante dos horas. Se usó un rango de dilución de anticuerpo de 1:200. Posterior a una segunda etapa de tres lavados con TBS-tween 20 durante diez minutos cada uno, se incubaron las membranas con el segundo anticuerpo (policlonal) en una dilución de 1:20.000 durante una hora. Finalmente se efectuó una última etapa de tres lavados con TBS-tween 20 de diez minutos cada uno. Las membranas fueron sometidas al sustrato “SuperSignal® west dura extended duration substrate” que genera quimioluminiscencia, para luego ser expuestas a películas fotosensibles donde queda registrada la emisión de luz de cada muestra.

La reacción positiva (presencia de nitración de proteínas en tirosina) se evidenció a través de bandas luminosas.

Se utilizó el estándar comercial “Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range” para estimar la masa molecular de las proteínas detectadas.

### **Control del primer anticuerpo**

Con el objetivo de corroborar la especificidad del primer anticuerpo, se sometieron a “western blot” dos muestras de líquido sinovial. Estas muestras se obtuvieron a través de punción aséptica desde la articulación metacarpofalángica de un potrillo de 4 semanas de edad con un cuadro de poliartritis séptica a causa de una septicemia.

Una de las muestras fue utilizada como control mientras que la muestra otra fue sometida a estrés nitrosativo en una solución HCl 0,6 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,7 M, NaNO<sub>2</sub> 0,6 M y NaOH 1,5 M en una proporción 10:1 durante 30 minutos. Ambas muestras fueron cargadas en una solución tampón que contenía Tris-HCl 33 mM pH 6,8, SDS al 10%, glicerol al 1% y azul de bromofenol al 0,005%, en una proporción 1:1.

Posteriormente se realizó un “western blot” bajo las condiciones descritas en la sección anterior, cargando 13µg de proteína.

### **Control del segundo anticuerpo**

Con el fin de evaluar la especificidad del segundo anticuerpo policlonal se sometieron las veinte muestras de membrana sinovial y las muestras de líquido sinovial provenientes de articulación metacarpofalángica séptica a una electroforesis y transferencia tal como se describe en la sección anterior, pero incubando sólo con el anticuerpo secundario.

### **Densitometría**

Se procedió a digitalizar cada film fotosensible para luego ser analizado por el programa computacional UNI-SCAN-IT, el cual detecta la cantidad de pixeles presentes en cada banda lo cual es directamente proporcional a la emisión de luz. Esto permitió realizar una estimación cuantitativa de las proteínas nitradas en tirosina.

### **Análisis de datos**

Se agrupó la información obtenida de los análisis de las muestras en tablas que reúnen la información sobre RCN, proteínas totales y análisis histológico. Se presentan los valores promedio de cada grupo junto a su desviación estándar.

Se aplicó la prueba estadística de “t de Student” para comparar los promedios de la cantidad de grupos isógenos entre ambos grupos, los promedios de los pixeles obtenidos del análisis de las membranas sinoviales incubadas con primer y segundo anticuerpo y los promedios de los pixeles obtenidos de la incubación de membranas sinoviales con primer y segundo anticuerpo *versus* la incubación sólo con segundo anticuerpo.

## RESULTADOS

Se utilizaron muestras de líquido sinovial, membrana articular y cartílago articular provenientes de equinos beneficiados en el Matadero Municipal de La Pintana. Del total de articulaciones analizadas, se seleccionaron 20 las cuales fueron distribuidas en dos grupos según el RCN. En la tabla 2 se aprecian los promedios del RCN y de la concentración de proteínas del líquido sinovial de cada grupo, junto a su desviación estándar.

**Tabla Nro. 2:** Promedio y desviación estándar de RCN y concentración de proteínas de líquido sinovial en cada grupo de estudio

Grupo	Recuento células nucleadas	[Proteína] mg/ml
Grupo A (n=10)	603 ± 203	8 ± 2
Grupo B (n=10)	3930 ± 3752	9 ± 5

### Análisis histológico

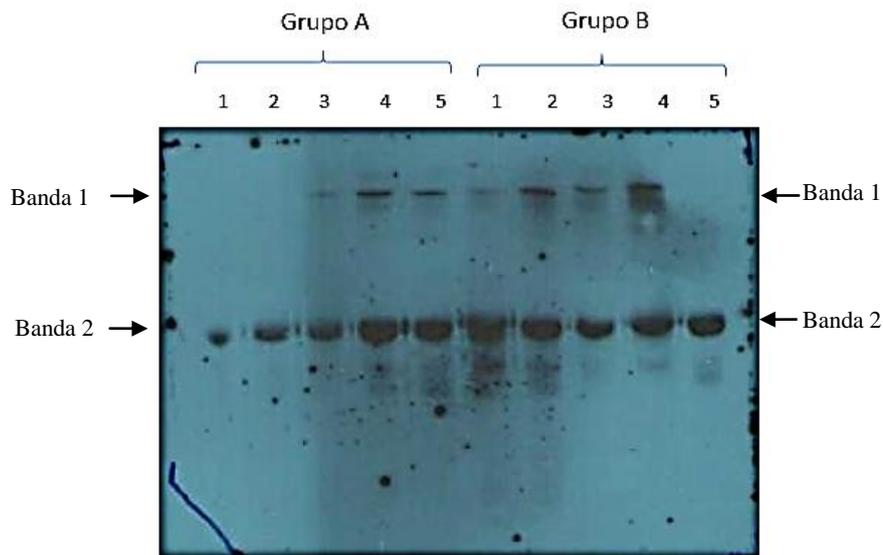
Las muestras de cartílago articular fueron sometidas a un análisis histológico, obteniéndose la cantidad de células por mm<sup>2</sup>, lagunas por mm<sup>2</sup> y grupos isógenos por mm<sup>2</sup>. En la tabla 3 se muestra el resultado obtenido para cada grupo, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en la cantidad de células por mm<sup>2</sup> como en la cantidad de lagunas por mm<sup>2</sup>. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de grupos isógenos por mm<sup>2</sup> entre el grupo A y el grupo B.

**Tabla Nro. 3:** Análisis histológico del cartílago articular de los grupos A y B, mostrando diferencias significativas en el recuento de grupos isógenos (p<0,05)

Grupo	Células/mm <sup>2</sup>	Lagunas/mm <sup>2</sup>	Grupos isógenos/mm <sup>2</sup>
Grupo A (n=10)	246 ± 70	30 ± 10	26 ± 22 *
Grupo B (n=10)	272 ± 91	36 ± 18	53 ± 39*

### Western blot membrana sinovial

Se realizó un “western blot” de homogeneizados de membrana sinovial de cada grupo, en condiciones reductoras y desnaturizantes para evidenciar la presencia de proteínas nitradas en tirosina. Se encontró una banda de alrededor de 200 KDa (banda 1) en seis de las membranas sinoviales del grupo A y en ocho de las membranas sinoviales pertenecientes al grupo B. Además, se observó la presencia de una banda de alta intensidad en las veinte muestras de membrana sinovial, de alrededor de 73 KDa (banda 2).



**Figura Nro. 1:** “Western blot” de homogeneizados de membrana sinovial de articulación metacarpofalángica de los grupos A (n=10) y B (n=10). Se usó anticuerpo primario anti-3-NT a una dilución 1:200 y se cargaron 10 µg de proteína por muestra. Se observa la presencia de dos bandas reconocidas por los anticuerpos: banda 1 y 2.

La cantidad de pixeles detectados en la banda 2 se presenta a continuación en la tabla 4.

**Tabla Nro. 4:** Cantidad de pixeles detectados en banda 2 en las membranas sinoviales de grupo A y B, luego de la incubación con primer y segundo anticuerpo

Grupo	1° y 2° anticuerpo pixeles totales banda N°2
Grupo A (n=10)	12097 ± 4351
Grupo B (n=10)	10517 ± 4462

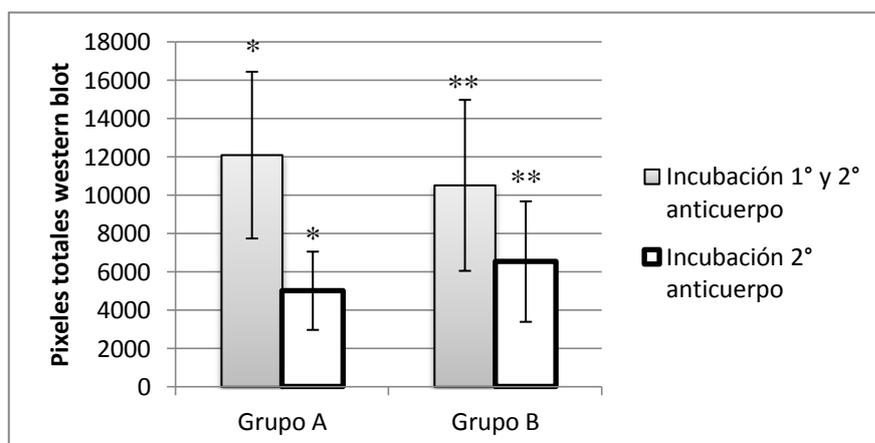
## Control del segundo anticuerpo

Con el objetivo de verificar la especificidad del segundo anticuerpo policlonal, se incubaron las muestras de membrana sinovial correspondiente a cada grupo con el segundo anticuerpo anti IgG de ratón. Se obtuvo señal positiva de luminiscencia en las dos bandas proteicas detectadas en la incubación con ambos anticuerpos, pero de menor intensidad. El resultado del análisis de pixeles de las bandas se muestra en la tabla 5.

**Tabla Nro. 5:** Cantidad de pixeles detectados en las membranas sinoviales correspondientes a cada grupo, incubadas con segundo anticuerpo anti IgG de ratón

Grupo	2° anticuerpo pixeles totales membrana sinovial
Grupo A (n=10)	5016 ± 2042
Grupo B (n=10)	6539 ± 3145

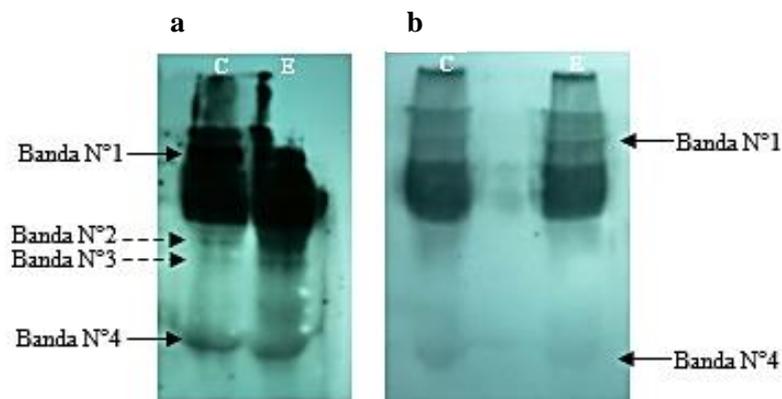
El número de pixeles obtenidos de la incubación de las membranas sinoviales de ambos grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, la diferencia entre la incubación con el 1° y 2° anticuerpo y la incubación únicamente con el 2° anticuerpo presenta diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. La diferencia de pixeles detectados entre ambos tipos de incubaciones se muestra en la figura N°2.



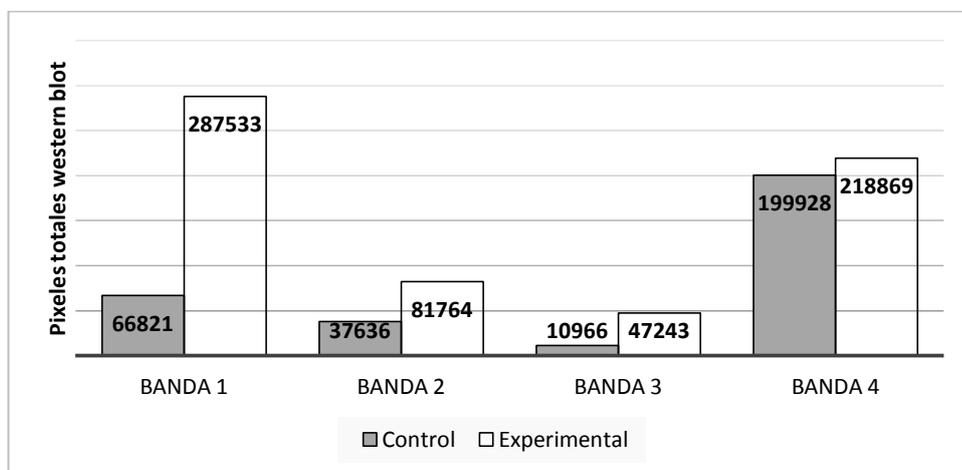
**Figura Nro. 2:** Comparación de la cantidad de pixeles detectados en muestras de membrana sinovial de grupos A y B, en la incubación con primer y segundo anticuerpo *versus* la incubación sólo con segundo anticuerpo mostrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

### Control del primer anticuerpo

Con el fin de verificar la especificidad del primer anticuerpo, se incubaron con el primer y segundo anticuerpo muestras de líquido sinovial patológicas provenientes de una articulación metacarpofalángica séptica. La muestra experimental sometida a estrés nitrosativo evidencia una mayor intensidad en tres bandas proteicas, lo que se refleja en un mayor número de pixeles comparado con la muestra control. Los resultados obtenidos se muestran en la figura N°3 y 4.



**Figura Nro. 3:** “Western blot” de líquido sinovial proveniente de articulación metacarpofalángica con un cuadro séptico tratado con peroxinitrito (E) y control (C). En “a” se muestra el tratamiento con los anticuerpos primario (anti-3NT, dilución 1:200) y secundario. En “b” sólo se incubó con el anticuerpo secundario. Las flechas de línea continua indican las bandas presentes en ambos tipos de incubaciones, y las flechas de línea discontinua indican las bandas identificadas sólo por el primer anticuerpo (bandas 2 y 3).



**Figura Nro. 4:** Cantidad de pixeles detectados en muestras de líquido sinovial séptico incubadas con primer anticuerpo anti 3-NT y con segundo anticuerpo anti-IgG de ratón

A su vez, se incubaron con el segundo anticuerpo las muestras de líquido sinovial provenientes de articulación metacarpofalángica séptica. Si bien hay interacción inespecífica del segundo anticuerpo con dos proteínas presentes en las muestras, existe una diferencia en la cantidad de pixeles detectados obteniéndose mayor intensidad de señal en las muestras incubadas con primer y segundo anticuerpo. El resultado de la detección de pixeles en las bandas presentes se muestra en la tabla N°6.

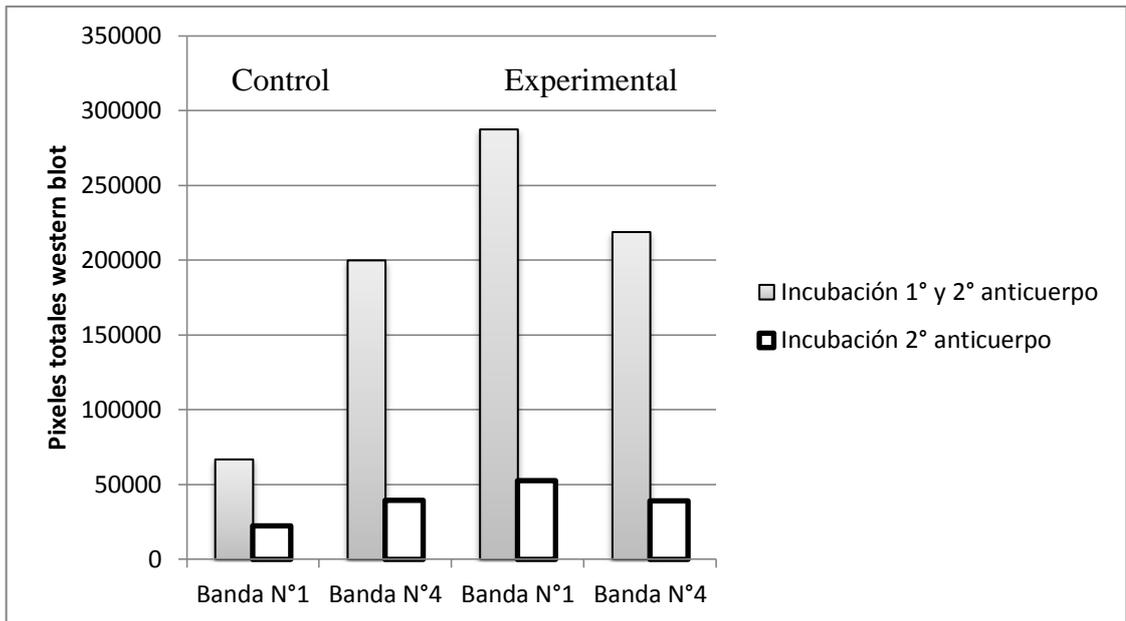
**Tabla Nro. 6:** Cantidad de pixeles detectados en muestras de líquido sinovial séptico incubadas con segundo anticuerpo anti IgG de ratón

Muestra	Banda proteica	2° anticuerpo pixeles totales líquido sinovial séptico
Control	Banda 1	22243
	Banda 2	*
	Banda 3	*
	Banda 4	39646
Experimental	Banda 1	52482
	Banda 2	*
	Banda 3	*
	Banda 4	39156

\*No existe detección de estas bandas en la incubación con segundo anticuerpo

En el control del segundo anticuerpo realizado a las muestras de líquido sinovial séptico se encontró una diferencia en el número de pixeles detectados entre la incubación con primer y segundo anticuerpo y la incubación únicamente con segundo anticuerpo en dos bandas proteicas. También se detectó la presencia de dos bandas proteicas que no generan reactividad cruzada con el segundo anticuerpo, por lo que no se encuentran presentes en el film obtenido de la incubación con el segundo anticuerpo.

El número de pixeles obtenidos de los líquidos sinoviales sépticos, y la diferencia existente entre el número de pixeles en la incubación con primer y segundo anticuerpo *versus* la incubación únicamente con segundo anticuerpo se muestran en la figura N°5.



**Figura Nro. 5:** Comparación de la cantidad de píxeles detectados en dos bandas proteicas de muestras de líquido sinovial séptico, incubadas con primer y segundo anticuerpo *versus* la incubación sólo con segundo anticuerpo

## DISCUSIÓN

La 3-NT es reconocida como un marcador biológico del aumento de la expresión de las isoenzimas NOS frente a un fenómeno patológico. Especialmente, se convierte en un reflejo de la expresión de la isoforma iNOS dado que cataliza la síntesis de altas concentraciones de NO. Los métodos de detección de la 3-NT son mediante inmunoquímica, espectrofotometría con luz visible y ultravioleta, cromatografía de gas asociada a espectrometría de masa y cromatografía líquida de alto rendimiento asociada a espectrofotometría visible y luz ultravioleta, fluorescencia, electroquímica y espectrometría de masa (Yang *et al*, 2010). Dentro de las técnicas de inmunoquímica se encuentra el inmunoblot o “western blot”, técnica utilizada en el presente estudio y que genera una detección semicuantitativa de los residuos de tirosina nitrados (Yang *et al*, 2010).

Para el estudio se tomaron articulaciones metacarpofalángicas sin alteraciones macroscópicas, por lo que es esperable que los niveles de mediadores inflamatorios se encuentren dentro de rangos fisiológicos o levemente aumentados.

Pritzker *et al* (2006) define el grado de una osteoartritis como la “profundidad de la progresión de la osteoartritis en el cartílago”. A su vez, el estado de una osteoartritis se define como la “extensión horizontal del daño del cartílago en una articulación”. Es así como para clasificar el nivel de alteración de una articulación se utiliza un “score” que involucra una evaluación del grado y estado de una osteoartritis, por tanto, una evaluación de su severidad y extensión (Pritzker *et al*, 2006).

Para el presente estudio se decidió utilizar articulaciones considerando el grado de daño del cartílago tomando muestras con un nivel leve de osteoartritis, criterio que fue escogido en base únicamente a cambios histológicos del cartílago. Los cortes tomados de cartílago articular fueron superficiales sin obtención de hueso subcondral ya que independiente de la articulación involucrada, los cambios patológicos en el cartílago articular comienzan desde la superficie. Esto sumado a que una articulación con cambios en el hueso subcondral cursa con una osteoartritis grado 5 o 6 (Pritzker *et al*, 2006), y las muestras sujeto del estudio están en grado 1 y 2, por tanto en una etapa temprana de OA.

La clasificación histológica se basó en el método descrito por McIlwraith *et al* (2010) el cual se centra en el análisis de la integridad de la capa superficial del cartílago articular,

recuento de condrocitos, lagunas vacías y recuento de grupos isógenos. Si bien en las veinte muestras utilizadas no existen diferencias en el recuento de condrocitos y de lagunas vacías, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el recuento de grupos isógenos o “clusters” entre el grupo A y B. Estos grupos isógenos representan condrocitos en proliferación que no se encuentran presentes en un cartílago articular sano, lo que da cuenta de que las articulaciones clasificadas en el grupo B se encuentran sufriendo cambios patológicos que pueden conducir a una OA.

Considerando el recuento de células en líquido sinovial se puede afirmar que aún no existe un reclutamiento importante de células inflamatorias, por lo que es esperable que no existan modificaciones importantes en los componentes articulares. En el caso de la membrana sinovial, se esperaba encontrar leves modificaciones que dieran cuenta de un daño inicial a través de la nitración de proteínas en tirosina. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la detección de 3-NT entre ambos grupos. Esto indica que si bien, efectivamente existen cambios patológicos en la articulación, aun son muy leves en contraste con una articulación que presenta un daño crónico con mayor desgaste articular sumado a la degradación de los componentes articulares y, por ende, mayor nivel de mediadores inflamatorios, estrés nitrosativo y 3-NT.

Se describe que alrededor del 0,00001 a 0,001% de los residuos de tirosina son nitrados en células u órganos patológicos (Ghesquiere *et al*, 2009), tal como lo describe Zhang *et al* (2006) donde identifica 31 sitios de nitración de tirosina de un total de 7792 proteínas en cerebro de ratón, estando asociadas al menos la mitad de estas proteínas a enfermedades neurodegenerativas. Por esto se define que la nitración de proteínas en tirosina es un fenómeno altamente selectivo, lo cual concuerda con el hallazgo negativo de proteínas nitradas en tirosina en membrana sinovial de articulaciones sin alteraciones macroscópicas en este trabajo.

No existen estudios previos que describan la detección de 3-NT en membrana sinovial equina. Van der Harst *et al* (2006) midió la concentración de 3-NT en cartílago articular, hueso subcondral y hueso trabecular de primera falange de articulaciones equinas jóvenes, maduras y con OA, encontrando mayor concentración de 3-NT en hueso subcondral en el grupo OA *versus* los dos restantes ( $p < 0,001$ ).

En este estudio se observó una reacción inespecífica del segundo anticuerpo con proteínas del equino, principalmente con la albúmina que al ser la proteína de mayor

abundancia generó una banda de gran intensidad. Esta reacción inespecífica interfiere con la interpretación de los resultados puesto que oculta la presencia de otras proteínas de símil peso molecular que pudiesen estar nitradas en tirosina. A su vez, pone en duda si las proteínas nitradas ante el “western blot” se encuentran realmente nitradas en tirosina o corresponden únicamente al efecto de la interferencia del segundo anticuerpo. Con el objetivo de corroborar este efecto se incubaron las muestras MS de ambos grupos con el segundo anticuerpo, obteniéndose una señal de menor intensidad lo que sugiere que aun cuando el segundo anticuerpo reacciona inespecíficamente, sí hay presencia de proteínas nitradas. En el caso de la albúmina, existe una diferencia estadísticamente significativa entre su señal emitida en la incubación con primer y segundo anticuerpo *versus* la incubación sólo con el segundo anticuerpo. Esta diferencia puede dar cuenta de una nitración basal de la albúmina, tal como ocurre en condiciones fisiológicas con nitración de biomoléculas como DNA, lípidos y diversas proteínas (Ghesquiere *et al*, 2009). También se presentó reactividad cruzada al incubar el líquido sinovial séptico sometido a estrés nitrosativo *in vitro*, sin embargo, esto demostró que la reacción inespecífica del segundo anticuerpo no ocurriría con todas las proteínas del equino ya que existen dos bandas proteicas claramente identificadas por el primer anticuerpo que no están presentes en la incubación con el segundo anticuerpo. Esto demuestra que efectivamente la señal emitida corresponde a la presencia de nitrotirosina en el tejido, y no es responsabilidad únicamente de esta interacción inespecífica.

La concentración proteica del líquido sinovial corresponde al 25-35% de las proteínas plasmáticas, de las cuales aproximadamente al 60% de las proteínas presentes en el líquido sinovial corresponden a albúmina (Steel, 2008). Su concentración relativa disminuye en cuadros inflamatorios y sépticos ya que se altera el perfil electroforético con respecto al líquido sinovial normal (Steel, 2008). Debido a este fenómeno es que en las muestras de líquido sinovial séptico fue posible detectar la presencia de proteínas nitradas en tirosina.

Sin embargo, se da como negativa la detección de proteínas nitradas en tirosina en membrana sinovial, puesto que la albúmina es una proteína proveniente del torrente sanguíneo que pertenece al perfil proteico del líquido sinovial. Este fenómeno ocurre debido a que a pesar de los sucesivos procesos de lavado de la membrana, no fue posible retirar el 100% del líquido sinovial presente en las muestras, generando así la banda interferente.

Es posible que si las articulaciones objeto del estudio hubiesen presentado mayores cambios patológicos coincidentes con OA se hubiesen detectado proteínas nitradas en tirosina. El siguiente paso para el presente estudio es evaluar la presencia de 3-NT en articulaciones con un daño más avanzado, considerando articulaciones con cartílago articular al menos en grado tres. A su vez, sería interesante el uso de otras metodologías más sensibles para evaluar la relación de la 3-NT con la patogénesis de la OA.

## CONCLUSIÓN

Existe una relación entre el RCN en líquido sinovial y el estado del cartílago articular, esto de acuerdo a lo hallado en el análisis histológico observándose una mayor cantidad de grupos isógenos en las articulaciones con mayor RCN. Esto indica que el RCN podría ser utilizado como un parámetro que refleje daño inicial en el cartílago articular de articulación metacarpofalángica de equino.

No se detectaron proteínas nitradas en tirosina en las muestras de membrana sinovial de ambos grupos. Sin embargo, probablemente existe una nitración basal de la albúmina corroborado por la diferencia encontrada en la cantidad de pixeles en la incubación con primer y segundo anticuerpo *versus* la incubación sólo con segundo anticuerpo. Esta nitración basal no presentó diferencia entre ambos grupos.

Se utilizó un sistema de nitración *in vitro* que permitió nitrar proteínas provenientes de articulación metacarpofalángica séptica, lo que podría indicar que a pesar del cuadro séptico e inflamatorio la nitración de proteínas en el líquido sinovial es parcial.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABELLO.** 2009. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res* 8(7): 3222-3238.
- ABRAMSON, S.** 2008a. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*. 16(Suppl 2): S15-S20.
- ABRAMSON, S.** 2008b. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 10 (Suppl 2):S2.
- AN, Y.; MARTIN, K.** 2003. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Humana Press. New Jersey, Estados Unidos. 587 p.
- BERENBAUM, F.** 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* 21: 16-21.
- CARON, J.** 2011. Osteoarthritis. **In:** Ross, M.; Dyson, S. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2ª ed. Elsevier. Estados Unidos. pp. 655-668.
- FEELISCH, M.** 2008. The chemical biology of nitric oxide – an outsider’s reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16 (Suppl 2): S3–S13.
- FRIESBIE, D.** 2011. Markers of Osteoarthritis: Implications for early diagnosis and monitoring of the pathological course and effects of therapy. **In:** Ross, M.; Dyson, S. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 2ª ed. Elsevier. Estados Unidos. pp. 668-671.
- FRISBIE, D.** 2006. Synovial Joint Biology and Pathobiology. **In:** Auer, J.; Stick, J. *Equine Surgery*. 3ª ed. Elsevier Saunders. Estados Unidos. Pp.1036-1055.
- GHEQUIERE, B.; COLAERT, N.; HELSENS, K.; DEJAGER, L.; VANHAUTE, C.; VERLEYSSEN, K.; KAS, K.; TIMMERMAN, E.; GOETHALS, M.; LIBERT, C.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K.** 2009. In vivo and in vitro protein-bound tyrosine nitration characterized by diagonal chromatography. *Mol Cell Proteomics* 8(12): 2642-2652.
- HRABÁROVÁ, E.; GEMEINER, P.; SOLTÉS, L.** 2007. Peroxynitrite: in vivo and in vitro synthesis and oxidant degradative action on biological systems regarding biomolecular injury and inflammatory processes. *Chem. Pap.* 61(6): 417-437.

- LEMAITRE, M.** 2010. Caracterización histológica del cartílago de la articulación metacarpofalángica equina macroscópicamente sana y su relación con el recuento celular del líquido sinovial y el contenido de MMP-2 y 9. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 46 p.
- 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.
- MANKIN, H.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A.** 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg* 53A(3):523-537.
- MCILWRAITH, C.; FRISBIE, D.; KAWCAK, C.; FULLER, C.; HURTIG, M.; CRUZ, A.** 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* 18: S93-S105.
- MISKO, T.; RADABAUGH, M.; HIGHKIN, M.; ABRAMS, M.; FRIESE, O.; GALLAVAN, R.; BRAMSON, C.; HELLIO LE GRAVERAND, M.; LOHMANDER, L.; ROMAN, D.** 2013. Characterization of nitrotyrosine as a biomarker for osteoarthritis and joint injury. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 151-156.
- NEMIROVSKIY, O; RADABAUGH, M.; AGGARWAL, P.; FUNCKES-SHIPPIY, C.; MNICH, S.; MEYER, M.; SUNYER, T.; MATHEWS, R.; MISKO, T.** 2008. Plasma 3-nitrotyrosine is a biomarker in animal models of arthritis: Pharmacological dissection of iNOS role in disease. *Nitric Oxide* 20: 150-156.
- PEASE, A.** 2012. Biochemical evaluation of equine articular cartilage through imaging. *Vet Clin Equine* 28(3): 637-646.
- PRITZKER, K.; GAY, S.; JIMENEZ, S.; OSTERGAARD, K.; PELLETIER, J.; REVELL, P.; SALTER, D.; PATH, F.; VAN DER BERG, B.** 2006. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *OsteoArthritis Cartilage* 14: 13-29.
- RADI, R.** 2013. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. of Chem. Res.* 46(2): 550-559.
- ROUSSEAU, J.; GARNERO, P.** 2012. Biological markers in osteoarthritis. *Bone* 51: 265-277.

- SOUZA, J.; PELUFFO, G.; RADJ, R.** 2008. Protein tyrosine nitration- Functional alteration or just a biomarker?. *Free Radic Biol Med* 45: 357-366.
- STEEL, C.** 2008. Equine Synovial Fluid Analysis. *Vet Clin Equine* 24(2): 437-454.
- SYSLOVÁ, K.; BOHMOVÁ, A.; MIKOSKA, M.; KUZMA, M.; PELCLOVÁ, D.; KACER, P.** 2014. Multimarker Screening of oxidative stress in aging. [en línea]. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014:1-14. <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/562860>> [consulta: 12-01-2015].
- TASKIRAN, D.; STEFANOVIC-RACIC, M.; GEORGESCU, H.; EVANS, C.** 1994. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 200:142–148. (citado por ABRAMSON, S. 2008a. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*. 16(Suppl 2): S15-S20).
- TOHGI, H.; ABE, T.; YAMAZAKI, K.; MURATA, T.; ISHIZAKI, E.; ISOBE, C.** 1999. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 269(1):52–54. (citado por Syslová, K.; Bohmová, A.; Mikoska, M.; Kuzma, M.; Pelclová, D.; Kacer, P. 2014. Multimarker Screening of oxidative stress in aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Volume 2014).
- VAN DER HARST, M.; BULL, S.; BRAMA, P.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P.; VAN DE LEST, C.** 2006. Nitrite and Nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subcondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. *J Rheumatol* 33: 1662-1667.
- VAN WEEREN, P.; FIRTH, E.; BROMMER, H.; HYTTINEN, M.; HELMINEN, H.; ROGERS, C.; DeGROOT, J.; BRAMA, P.** 2008. Early exercise advances the maturation of glycosaminoglycans and collagen in the extracellular matrix of articular cartilage in the horse. *Equine vet. J.* 40(2): 128-135.
- VERWILGHEN, D.; BUSONI, V.; GANGL, M.; FRANCK, T.; LEJEUNE, J.; VANDERHEYDEN, L.; DETILLEUX, J.; GRULKE, S.; DEBERG, M.; HENROTIN, Y.; SERTEYN, D.** 2009. Relationship between biochemical markers

and radiographic scores in the evaluation of the osteoarticular status of Warmblood stallions. *Res Vet Sci* 87:319–328.

**VUOLTEENAHO, K.; MOILANEN, T.; KNOWLES, R.; MOILANEN, E.** 2007. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol.* 36(4):247-58

**YANG, H.; ZHANG, Y.; PÖSCHL, U.** 2010. Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins. *Anal Bioanal Chem* 397: 879-886.

**YEO, W.; LEE, S.; LEE, J.; KIM, K.** 2008. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Reports.*

**ZHANG, Q.; QIAN, W.; KNYUSHKO, T.; CLAUSS, T.; PURVINE, S.; MOORE, R.; SACKSTEDER, C.; CHIN, M.; SMITH, D.; CAMP, D.; BIGELOW, D.; SMITH, R.** 2006. A Method for Selective Enrichment and Analysis of Nitrotyrosine-Containing Peptides in Complex Proteome Samples. *J Proteome Res.* 6(6):2257-2268.