



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

**Separación del Ácido Hialurónico desde Líquido Sinovial de articulación metacarpo-falángica equina macroscópicamente normal con alto y bajo recuento de células nucleadas**

**Sina Maria Ströh**

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

PROFESOR GUÍA: Dr. Héctor Adarmes A.

Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2018

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



**Separación del Ácido Hialurónico desde Líquido Sinovial de articulación metacarpo-falángica equina macroscópicamente normal con alto y bajo recuento de células nucleadas**

**Sina Maria Ströh**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencia  
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: Dr. Héctor Adarnes A

Nota Final: .....

Profesor Guía: Héctor Adarnes: .....

Profesora Correctora: Ana María Ramírez: .....

Profesor Corrector: Marco Galleguillos: .....

Santiago, Chile

2018

## Agradecimiento

Agradezco a mi familia, especialmente a mi papá que siempre me apoyó e hizo posible realizar mi sueño de estudiar medicina veterinaria. A mi familia chilena, por recibirme como una integrante más y ayudarme en todo.

Infinitas gracias a mi profesor guía Héctor Adarmes, por ser una gran persona y ayuda en el desarrollo de esta memoria de título. Al profesor Marco Galleguillos, por siempre estar dispuesto a colaborar y enseñar y a la profesora Ana María Ramírez. Al Sr. Víctor Molina, la Sra. Elcira Valenzuela y a Francisca Benito por su colaboración en el trabajo de laboratorio. De no ser por ellos esta memoria no habría sido posible.

Finalmente quiero agradecer a mi pareja, Andrew, por ser un apoyo fundamental en esta etapa y a mis amigas y compañeras de Universidad, por acompañarme durante toda la carrera, ya que sin Uds. no habría sido capaz de terminar y también a los Felipes, que siempre me trajeron algo para comer cuando estaba estudiando toda la noche y cuando llegue cansada a la casa.

*Vielen lieben Dank an meine Familie und ein besonderes Dankeschön an meinen Vater der mein Studium ermöglicht hat. Auch ein grossen Dank an meine Chilenische Familie die mich wunderbar aufgenommen haben.*

*Vielen Dank an meinen Professor Héctor Adarmes, für seine Hilfe und dafür das er ein toller Mensch ist. An Professor Marco Galleguillos , für seine Hilfsbereitschaft und an die Professorin Ana Maria Ramirez. An Víctor Molina , Elcira Valenzuela und an Francisca Benito für ihre Hilfe in dem Labor, ohne ihre Hilfe hätte ich diese Arbeit nicht machen können.*

*Zum Schluss möchte ich meinem Lebensgefährten Andrew danken und meinen Freundinnen für ihre Unterstützung. Auch den Felipes ein ganz grosses Dankeschön dafür, dass sie mir immer was zu Essen gebracht haben, wenn ich die Nächte durchgelernt habe.*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	ii
ABSTRACT.....	ii
INTRODUCCION .....	1
REVISION BIBLIOGRAFICA .....	2
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS .....	10
DISCUSIÓN .....	13
CONCLUSIÓN .....	16
BIBLIOGRAFÍA .....	17
ANEXO .....	20

### TABLAS Y FIGURA

TABLA NRO.1.....	10
TABLA NRO.2.....	11
TABLA NRO.3.....	12
FIGURA NRO.1 .....	20

## **Resumen**

La molécula del ácido hialurónico (AH) tiene un gran valor económico por su uso en la industria cosmética, la medicina humana y veterinaria. En este trabajo se plantea como objetivo el separar esta molécula mediante filtración de líquido sinovial (LS) obtenido desde articulación sinovial equina que se destinan a la fabricación de harina de hueso. Se seleccionaron articulaciones metacarpo-falángicas macroscópicamente normales, cuyos LS se agruparon en un *pool* de alto (entre 1000-3000 células/ $\mu$ L) y otro de bajo recuento celular ( $< 500$  células/ $\mu$ L), con el fin de separar y comparar la concentración de AH. Se determinó la viscosidad de ambos *pools* con el fin de estimar el contenido de AH. Ambos *pools* se sometieron a filtración en vacío, utilizando papel filtro previamente pesado. La diferencia de peso entre los papeles pre y post filtración fue prácticamente igual, encontrándose valores de AH de 2,92 y 2,85 mg/mL en los *pools* con alto y bajo recuento celular, respectivamente, a pesar de la mayor viscosidad detectada en el *pool* de alto recuento celular que se asocia con una mayor cantidad de AH. Posiblemente, el incremento de estrés oxidativo asociado al mayor recuento celular, produciría una mayor degradación de moléculas de AH de alta masa molecular, generando fragmentos más pequeños ( $<300$  kDa) que atraviesan el papel filtro. Estos fragmentos podrían explicar la mayor viscosidad detectada en el *pool* de mayor recuento celular. En consecuencia esta técnica permite la separación de AH de masa molecular mayor a 300 kDa sin encontrar diferencia entre LS de alto y bajo recuento celular.

Palabras claves: Ácido Hialurónico, Líquido Sinovial, Estrés oxidativo

## **Abstract**

The hyaluronic acid (HA) molecule has a great economic value because of its use in the cosmetic industry as well as human and veterinary medicine. The aim of the study was to separate the molecule from the synovial fluid (SF) by filtration, obtained from equine synovial joints that are used for bone meal. Macroscopically normal metacarpo-phalangeal joints were selected, and were grouped into two pools, one of high cell count (between 1000-3000 cells/ $\mu$ L) and one low cell count ( $< 500$  cells/ $\mu$ L), to compare the concentration of HA. The viscosity was determined in both pools to estimate the HA content. Afterword's they were subjected to a vacuum filtration using pre-weighed filter paper. The paper weight difference between pre and post filtration procedure was basically the same, finding HA

values of 2,92 mg/mL and 2,85 mg/mL in the pools of high cell count and low cell count respectively, despite the higher viscosity detected in the pool of high cell count which is associated to a higher amount of HA. Possibly, the increase of oxidative stress associated with the higher cell count, would produce a greater degradation of HA molecules of high molecular mass, generating smaller fragments (<300 kDa) that penetrated the filter paper. These fragments could explain the higher viscosity detected in the pool of higher cell count. Consequently this technique allows the separation of HA of molecular mass higher than 300 kDa without finding differences between SFs of high and low cell counts.

Key words: Hyaluronic acid, synovial fluid, oxidative stress

## INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano (GAG) no sulfatado formado por unidades disacáridas repetidas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, que está presente en todos los fluidos biológicos de los vertebrados. Un humano de 70 kg contiene aproximadamente 15 g del AH en su cuerpo. Este GAG tiene gran importancia en los tejidos y fluidos, proporcionando la viscosidad característica al líquido sinovial (LS), que permite proteger el cartílago. En pacientes con osteoartritis, el AH ya no cumple esta función debido a que se reduce su cantidad y su masa molecular.

El AH tiene una gran importancia en la medicina, la estética y la industria cosmética. Esta molécula se puede obtener por fermentación microbiana alcanzando una masa molecular entre  $2 \times 10^3 - 3 \times 10^3$  kDa y una concentración de 2 mg/mL y también desde tejidos como humor vítreo del ojo y cordón umbilical. En el ojo humano su concentración es de 0,2 mg/mL, siendo variable según la especie. Su concentración en el LS de rodilla humana es 2 a 3 mg/mL, mientras que en el LS equino es 0,33 a 1,5 mg/mL, con una masa molecular de  $3 \times 10^2 - 2 \times 10^3$  kDa.

El proceso de obtención del AH desde los tejidos es bastante complejo e involucra una serie de etapas como digestión de proteínas y de ácidos nucleicos, desnaturalización de enzimas, extracción con cloroformo y centrifugaciones sucesivas. Por esto, uno de los objetivos de este trabajo es implementar una metodología física clásica que permita separar el AH desde el LS equino. Además, otro objetivo es determinar si la cantidad de AH obtenido, permite diferenciar entre articulaciones metacarpo-falángicas equinas macroscópicamente normales con bajo recuento celular ( $< 500$  células/ $\mu$ L) y con alto recuento celular (entre 1000-3000 células/ $\mu$ L), debido a que estas células podrían afectar la degradación del AH. De este modo, se pretende evaluar al AH como un marcador de daño prematuro a nivel articular.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Articulaciones**

Las articulaciones se clasifican en tres tipos de acuerdo a su movilidad: las sinartrosis (inmóviles), anfiartrosis (movimiento limitado) y diartrosis (móviles). Las diartrosis o también llamadas articulaciones sinoviales se encuentran en mayor cantidad, en general forman parte de los miembros y están compuestas por los huesos que se enfrentan, con superficies articulares lisas que presentan el cartílago articular, quedando un espacio articular que contiene el LS, rodeado de una membrana sinovial, una cápsula fibrosa articular y ligamentos (Frisbie, 2012).

### **Membrana sinovial**

La membrana sinovial, rodea la cavidad articular y está formado por dos capas: La capa íntima y la subíntima. La capa íntima se encuentra en contacto directo con el LS, y está compuesta hasta por cuatro capas de células, que carecen de membrana basal. Las células en la capa íntima tienen dos funciones básicas: fagocitosis y secreción. La capa subíntima está formada por tejido fibroso, conectivo areolar y tejido graso. Esta capa posee una rica vascularización e innervación, esta última proveniente desde ramas nerviosas periféricas y musculares (Frisbie, 2012).

Las células cuya función es la fagocitosis o pinocitosis se denominan sinoviocitos tipo A, en cambio aquellos responsables de sintetizar proteínas y AH, un glicosaminoglicano no sulfatado, se denominan sinoviocitos tipo B (Brannan y Jerrard, 2006). Se ha descrito un tipo intermedio entre sinoviocitos A y B que se denomina sinoviocito tipo C. Debido a que se ha demostrado que los sinoviocitos son dinámicos, es probable que las células tipo C representen formas de transición entre sinoviocitos A y B (Frisbie, 2012).

### **Líquido sinovial**

El LS es un dializado del plasma, que contiene algunos componentes plasmáticos con un tamaño menor de 10 kDa, como glucosa, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y proteínas. Además, contiene sustancias secretadas desde los tejidos de la articulación, como es el AH, que actúa como lubricante viscoso (Brannan y Jerrard, 2006; Frisbie, 2012). También se ha descrito la presencia de células de la serie blanca en el LS, pero en baja cantidad, menos de 500 células  $\mu$ L



(Todhunter, 1996), aunque también se describen valores normales hasta 1000 células/ $\mu\text{L}$  e incluso hasta 3000 en determinadas condiciones (Steel, 2008).

Se describe que el LS tiene dos funciones: una es proporcionar soporte mecánico a la articulación lubricando las superficies articulares y la otra es permitir la nutrición del cartílago articular actuando como un medio de transporte para nutrientes y eliminación de productos de desecho del cartílago articular como  $\text{CO}_2$  y lactato (Todhunter, 1996; Brannan y Jerrard, 2006).

### **Cartílago**

El cartílago articular contiene un único tipo de células (condrocitos) incrustados en una matriz extracelular (MEC) (Buckwalter *et al.*, 2005) que consiste en una red de fibras de colágeno tipo II y glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs establecen una alta densidad de carga fija negativa en la MEC del cartílago y, por lo tanto, permiten la interacción entre la fase sólida y la fase fluida. Esta carga neta negativa atrae agua y cationes solubles (por ejemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ) manteniendo la electro neutralidad del tejido (Boetcher *et al.*, 2016).

El cartílago articular amortigua los impactos que reciben las articulaciones y disminuye la fricción entre los huesos adyacentes, lo que previene el daño articular. Para esto, el cartílago tiene zonas con distinta estructura, composición y propiedades mecánicas. Así se distinguen zonas superficial (tangencial), media (transicional) y profunda (radial), cada una con propiedades y funciones diferentes. La forma celular, el tamaño, la actividad metabólica y la composición de la matriz extracelular varían en función de la profundidad del cartílago (Li *et al.*, 2007). Además, las zonas tienen distinta tensión de  $\text{O}_2$  lo que afecta la capacidad metabólica del condrocito (Juránek *et al.*, 2014).

El cartílago articular tiene una capacidad de curación intrínseca mínima o nula lo cual presenta un desafío clínico significativo en la medicina humana y veterinaria. La reparación eficaz está limitada debido a la ausencia de vasos y nervios en el cartílago, además de la limitada capacidad proliferativa de los condrocitos (Ortved y Nixon, 2016).

## Ácido hialurónico

El AH está presente en todos los fluidos corporales en diferentes concentraciones. Se encuentra en baja concentración en humor vítreo, linfa, suero sanguíneo y en orina. En cambio en el LS se encuentra una mayor concentración. Así, en la articulación de la rodilla en humanos la concentración de AH es de 2-3 mg/mL, un poco más elevado en jóvenes que en adultos mayores (Cowman *et al.*, 2015). En equinos se ha descrito que el contenido de AH se encuentra en un rango entre 0,33-1,5 mg/mL, con una masa molecular de  $2 \times 10^3$  kDa dependiendo del método utilizado para la determinación de AH (Howard y McIlwraith, 1996). Por otro lado, a través de un método indirecto, en que se restan los GAG's sulfatados de los GAG's totales, se determinó una concentración de 1,5 mg / mL de AH para la articulación metacarpo-falangica equina macroscópicamente normal (Adames *et al.*, 2006).

El método más simple y antiguo para medir el AH, corresponde a la determinación del contenido de ácido urónico, previa hidrólisis de proteínas mediante ácido sulfúrico concentrado. Además se puede determinar el contenido del AH mediante el análisis de los oligosacáridos producidos por degradación enzimática, que se cuantifican mediante métodos como el HPLC (High-performance liquid chromatophy), electroforesis capilar, espectrometría de masas. Estos métodos se han utilizado primariamente para determinar las cantidades relativas de GAG's de una muestra más que las cantidades absoluta de ellos. Existen métodos más sensibles, específicos y directas para determinar el contenido del AH como es el caso de ELISA (Cowman *et al.*, 2015).

En el LS la cantidad y el peso molecular del AH están determinados por un equilibrio entre síntesis y degradación de esta molécula (Tanimoto *et al.*, 2010). El AH es un glicosaminoglicano no sulfatado formado por unidades disacáridas repetidas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, que se sintetiza en los sinoviocitos B de la membrana sinovial (Brannan y Jerrard, 2006; Yanagida-Suekawa *et al.*, 2013). Esta síntesis se produce en la cara citoplasmática de la membrana plasmática debido a la actividad de tres isoformas de hialuronato sintasa (HAS). En la membrana sinovial la HAS1 y HAS2 polimerizan cadenas de AH con un tamaño bastante similar de hasta  $2 \times 10^3$  kDa, mientras que la HAS3 produce cadenas más cortas de 200 a 300 kDa (Tanimoto *et al.*, 2010).

Por otro lado, en un estudio en que se utilizaron sinoviocitos obtenidos desde articulación de conejo se encontró que la secreción de AH es estimulada por el estrés mecánico y al mismo tiempo la HAS2 fue la principal sintasa expresada lo que permitiría una adecuada lubricación y con eso la protección de la articulación. Al mismo tiempo también se encontró que la transcripción de HAS2 aumenta hasta 10 veces en respuesta a Factor de Crecimiento Tumoral beta 1 (TGF- $\beta$ 1) y Interleuquina beta 1 (IL- $\beta$ 1) (Mombberger *et al.*, 2005).

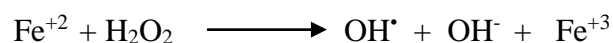
Entre las moléculas de AH el polímero de mayor masa molecular ( $2 \times 10^3$  kDa), es el más abundante en el LS bajo condiciones fisiológicas, mientras que en condiciones patológicas o inflamatorias se incrementan moléculas con menor masa molecular, lo que altera la función de lubricación de la articulación (Yanagida-Suekawa *et al.*, 2013).

Se describe que la vida media del AH en el LS es de aproximadamente doce horas. Este recambio fisiológico de la molécula de AH se debería a ciclos diurnos de oxigenación debidos al movimiento articular y ciclos nocturnos de hipoxia por falta de movimiento. Estos ciclos de hipoxia y oxigenación se asocian a generación de especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species* (ROS)) que explicarían el recambio molecular normal. Se ha descrito en la etapa de iniciación, la participación del radical hidroxilo ( $\cdot$ OH), que tiene la capacidad de arrancar un hidrógeno desde la molécula de AH provocando la formación de un C-radical en esta molécula. Este C-radical en la etapa de propagación reacciona con el oxígeno generando peróxidos que al ser inestables provoca la ruptura de esta macromolécula en dos fragmentos más pequeños, uno con un grupo carbonilo y otro con otro C-radical que puede propagar la reacción transformándose el proceso en auto-catalítico. Se describe que los fragmentos más pequeños son eliminados por vía linfática (Juraneck *et al.*, 2014).

Además, en articulación normal de carpo equino se han descrito niveles basales de IL-1, IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que también se podrían relacionar con el recambio molecular normal (Ma *et al.*, 2017). Por otro lado, en condiciones inflamatorias el estrés oxidativo se incrementa y los condrocitos aumentan la producción de factores pro-inflamatorio (Peng *et al.*, 2010), cuya consecuencia es la activación de una familia de enzimas denominadas hialuronidasas (HYAL). La HYAL1 y HYAL 2 presentan mayor actividad en el LS humano, encontrándose niveles más altos de HYAL 2 en pacientes con osteoartritis o artritis reumatoide que en controles sanos. La HYAL 2 degrada AH de alto peso molecular

en fragmentos más pequeños de aproximadamente 20 kDa (Tanimoto *et al.*, 2010). También se ha descrito que en la primera fase de la inflamación, aparece un aumento de células polimorfonucleares con el potencial de producir ROS (Yang *et al.*, 2018).

Los polimorfonucleares, presentan actividad NADPH oxidasa en sus membranas celulares, que producen el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), un sustrato de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que por reacción de dismutación genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que a su vez, puede producir el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) al reaccionar con  $Fe^{+2}$  mediante la reacción de Fenton (Corrales y Muñoz, 2012) que se muestra en el siguiente esquema:



Por otro lado, en articulaciones macroscópicamente normales también se ha observado que el incremento en el número de células nucleadas del LS ( $>1000$  células nucleadas/ $\mu$ L), produciría cambios histológicos prematuros en el cartílago articular como incremento de lagunas vacías (Lemaitre, 2010) y/o de grupos isógenos (Rojas de la Fuente, 2015).

### **Obtención del ácido hialurónico**

El proceso de obtención del AH desde los tejidos es bastante complejo e involucra una serie de etapas como digestión de proteínas y de ácidos nucleicos, desnaturalización de enzimas, extracción con cloroformo y centrifugaciones sucesivas (Cowman, *et al.*, 2015). Otra opción es la síntesis de moléculas de AH de alta masa molecular mediante fermentación bacteriana con *streptococcus zooepidemicus*, (Amado *et al.*, 2016).

Por esto se plantea en este trabajo la obtención de AH preformado desde el LS de la articulación equina a través de la implementación de un método rutinario simple y económico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Separación del ácido hialurónico desde líquido sinovial de articulación metacarpo-falángica equina macroscópicamente normal con alto y bajo recuento de células nucleadas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aplicar una metodología física para separar el ácido hialurónico desde el líquido sinovial equino.
2. Establecer si existen diferencias en el contenido de ácido hialurónico recuperado entre ambos grupos con alto y bajo recuento celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron 8 muestras de LS con un conteo celular bajo y 8 muestras con un conteo celular alto desde articulaciones macroscópicamente sanas. Estas muestras fueron extraídas desde la articulación metacarpo-falángica de equinos mestizos, de la Planta Faenadora Lo Blanco, Comuna La Pintana, Santiago. No se consideró la edad ni el sexo de los animales. El LS se obtuvo mediante artrocentesis aséptica con jeringa de 5 mL y agujas 21 G x 1 1/2. El LS se guardó en tubos con EDTA que se mantuvieron a una temperatura de aproximadamente 10 °C.

Luego se hizo una artrotomía con el objetivo de clasificar macroscópicamente la articulación. Las articulaciones normales presentaron un cartílago con su superficie lisa y brillante de un color blanco nacarado, sin congestión de las membranas sinoviales y el LS obtenido de color amarillo-transparente. Las articulaciones que presentaron daño macroscópico como son líneas de roce y/o focos de erosión en el cartílago, que indica daño crónico, y articulaciones con daño agudo como congestión de las membranas sinoviales y/o líquidos sinoviales sanguinolentos fueron descartadas del estudio (Adarmes *et al.*, 2006).

Desde el LS de cada articulación, se sacó una alícuota (200 µL) para el recuento celular usando la cámara Neubauer. A partir de este recuento se formaron 2 *pools*, uno de bajo recuento celular (500 células/µL) y otro de alto recuento celular (1000 - 3000 células/µL). Las muestras con recuentos entre 500-1000 células/µL se descartaron, al igual que aquellas con un recuento mayor a 3000 células/µL (Steel, 2018).

Luego las muestras de LS fueron centrifugadas, en una centrifugada refrigerada (Heraeus Biofuge primo R) a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C (Müller *et al.*, 2010) con el objetivo de eliminar células y restos de tejido.

Luego en los sobrenadantes con alto y bajo recuento celular se determinó la concentración de proteínas (Lowry *et al.*, 1951), utilizando una curva estándar con BSA, y la viscosidad (Saylo, 2006), a través del tiempo de recorrido de una esfera metálica en un tubo con 3 mL de LS en un pendiente de 9 grados a temperatura de 27° C. Este proceso se repitió 5 veces con el fin de obtener un promedio para la viscosidad. El volumen de cada *pool* fue de 10 mL al que se agregó 10 mL de suero fisiológico con lo cual se obtuvo, un volumen final de 20

mL para cada *pool*. Posteriormente cada *pool* se separó en 5 alícuotas iguales (4mL) que se sometieron a filtración por 30 minutos en vacío utilizando para cada alícuota un papel filtro distinto de porosidad de 0,2  $\mu\text{m}$  (Schleicher& Schüll), previamente pesado.

Los filtrados obtenidos de cada alícuota se reunieron nuevamente en un *pool*, determinándose el volumen obtenido y cuantificándose la concentración de proteínas y la viscosidad.

El papel filtro de cada alícuota se sometió a dos lavados sucesivos con 4 mL de NaCl 0,9 % cada uno, demorando el primero 15 minutos y el segundo 10 minutos de filtración. Los filtrados de cada lavado se agruparon, nuevamente como *pool* para la determinación de proteínas y viscosidad.

Para la determinación de las proteínas del LS puro, LS diluido y el filtrado se realizó una dilución 1/ 10 con suero fisiológico y para los lavados no se realizó ninguna dilución, debido a que hay una menor cantidad de proteínas.

Una vez terminado los lavados, los papeles filtros fueron secados en una estufa por 12 horas y posteriormente pesados, estableciéndose la diferencia de los pesos pre y post filtración y comparando los resultados de ambos *pools*.

## RESULTADOS

En este trabajo desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile se propuso separar el AH desde el LS de la articulación metacarpo-falángica equina y evidenciar diferencias entre articulaciones con diferente recuento celular. El protocolo utilizado para lograr la separación del AH, permite presentar los resultados en el siguiente orden: la viscosidad de ambos *pools* pre y post filtración, concentración de proteínas en ambos *pools* pre y post filtración y finalmente la cantidad de AH recuperado en ambos *pools* a través del pesaje del papel filtro.

### Viscosidad

La viscosidad se determinó tomando el tiempo recorrido de una esfera metálica en un tubo con 3 mL de LS, a temperatura de 27° C y una pendiente de 9 grados. El tiempo recorrido se puede relacionar en forma indirecta con la cantidad de AH (Tabla Nro.1).

<b>Tabla Nro.1:</b> Tiempo de recorrido de una esfera metálica en una pendiente de 9 grados en segundos. LS: líquido sinovial		
	<b><i>Pool</i> alto recuento celular</b>	<b><i>Pool</i> bajo recuento celular</b>
<b>LS</b>	10,8	6,8
<b>LS diluido</b>	2,8	1,8
<b>Filtrado</b>	1,8	1,2
<b>Lavado 1</b>	1,4	1,2
<b>Lavado 2</b>	1,3	1

Se observó mayor viscosidad en los líquidos sinoviales puros disminuyendo en forma brusca en la muestra diluida y luego en forma paulatina en el filtrado y en ambos lavados, lo que indicaría la retención de AH en el papel filtro. Al comparar las muestras puras se observó una mayor viscosidad en el *pool* de alto recuento celular lo cual se relacionaría con mayor



cantidad de AH. Además se encontró mayor viscosidad en el *pool* de alto recuento celular en cada una de las etapas, que indicaría una falta de retención de AH en el papel filtro.

### Determinación de proteínas

En ambos *pools*, se determinó la concentración de proteína (mg/mL y mg totales) en cada etapa del proceso de separación del AH (Tabla Nro.2).

<b>Tabla Nro. 2:</b> Determinación de proteínas pre y post filtración y de los volúmenes trabajados y recuperados. LS: líquido sinovial						
	<b>Pool alto recuento celular</b>			<b>Pool bajo recuento celular</b>		
<b>LS</b>	<b>Vol. ml</b>	<b>Proteína mg/mL</b>	<b>Proteína mg totales</b>	<b>Vol. ml</b>	<b>Proteína mg/mL</b>	<b>Proteína mg totales</b>
<b>LS pura</b>	10	15,5	154,8	10	18	180
<b>LS Diluido</b>	20	8,2	164,2	20	9,5	190,2
<b>Filtrado LS</b>	12	9,7	116,5	11,8	9,4	110,9
<b>Lavado 1</b>	18	1,8	32,8	18,5	1,3	23,8
<b>Lavado 2</b>	20	0,3	6,0	19	0,3	5,9

Para estas determinaciones, es necesario conocer el volumen recuperado en cada una de las etapas de filtración, los que resultaron similares tanto en el filtrado como en los lavados de ambos *pools*. Además, en los dos casos se puede observar una mayor concentración de proteína en los filtrados con respecto al LS diluido, que indicarían que la proteína no queda retenida en el papel filtro. Junto a esto, en ambos *pools* se puede observar que a partir de los filtrados se va produciendo una disminución paulatina de la proteína, que se iguala en el segundo lavado, obteniéndose cantidades mínimas de proteína que representarían el contenido casi total de la proteína original.

### Cuantificación del AH

Cada papel filtro representa una alícuota de 4 mL (2 mL LS y 2 mL de suero fisiológico) que se sometió a filtración y dos lavados sucesivos para cada *pool*. Al final de este conjunto de etapas, cada papel filtro fue secado por 12 horas y luego se cuantificó la cantidad del AH retenido por diferencia con el peso de cada papel filtro pre-filtración (Tabla Nro.3).

<b>Tabla Nro. 3:</b>		Peso y diferencia de los papeles pre y post filtración. Determinación de la cantidad de AH y su concentración en mg/mL, que se obtuvo dividiendo por 2 la diferencia de los pesos. AH: Ácido Hialurónico							
		<b><i>Pool alto recuento celular</i></b>				<b><i>Pool bajo recuento celular</i></b>			
<b>N° Papel</b>	<b>Peso papel pre filtración (mg)</b>	<b>Peso post secado (mg)</b>	<b>Δ (mg)</b>	<b>AH mg/mL</b>	<b>Peso papel pre filtración (mg)</b>	<b>Peso post secado (mg)</b>	<b>Δ (mg)</b>	<b>AH mg/mL</b>	
<b>1</b>	101,4	106,1	4,7	2,35	96,4	103,2	6,8	3,4	
<b>2</b>	101,5	108,4	6,9	3,45	96,3	103,1	6,8	3,4	
<b>3</b>	101,8	107,6	5,8	2,9	95,1	99,1	4	2	
<b>4</b>	95	99,9	4,9	2,45	93,3	99,7	6,4	3,2	
<b>5</b>	96,8	103	6,2	3,1	95	100,2	5,2	2,6	
$\bar{x}$ AH				<b>2,92</b>	$\bar{x}$ AH				<b>2,85</b>

En ambos *pools* los papeles filtros post-filtración aumentaron de peso y se deduce que este aumento se debe al contenido de AH retenido. Para obtener la concentración de AH la diferencia obtenida entre los papeles se dividió por dos debido a que cada alícuota correspondía a 2 ml del LS. Finalmente se obtuvo el promedio de AH para ambos *pools*.

## DISCUSIÓN

El AH es una molécula con un gran valor económico debido a su uso en la industria cosmética, en la medicina humana y veterinaria. Su obtención es compleja y costosa, tanto a partir de diferentes tejidos donde el AH está preformado como también a través de cultivos bacterianos, que permiten su síntesis en medios controlados. Debido a estas complejidades, en este trabajo se evaluó la separación del AH preformado desde el LS de la articulación metacarpo-falángica equina, que constituye una buena opción para obtener un valor agregado a partir de articulaciones sinoviales que son utilizadas para obtener harinas de origen animal.

El AH es un glicosaminoglicano no sulfatado, que se encuentra en la mayor parte de los tejidos formando parte de las matrices extracelulares. En el caso de las articulaciones sinoviales es sintetizado por los sinoviocitos B y proporcionan la viscosidad característica al LS (Brannan y Jerrard, 2006). Por esta asociación se midió la viscosidad (Saylo, 2006) del LS y de los filtrados de las diferentes etapas del trabajo, observándose una disminución de la viscosidad (Tabla 1) en ambos *pools* que indicarían la retención de AH en el papel filtro. En los dos *pools* se obtuvieron valores de viscosidad en el filtrado y los lavados - que aunque menores al LS diluido - indicarían un remanente de moléculas de AH de menor peso molecular (< 300 kDa) que podrían atravesar el poro de 0,2  $\mu\text{m}$  del papel filtro. Sin embargo, en cada una de las etapas relacionada con el *pool* de alto recuento celular, se encontró un aumento de la viscosidad con respecto al *pool* de bajo recuento celular, que se podría explicar con una disminución en el tamaño de las moléculas de AH como producto de estrés oxidativo y/o actividad de hialuronidasas (Yang *et al.*, 2018) que degradan el AH (Yanagida-Suekawa *et al.*, 2013). El estrés oxidativo se podría incrementar en el *pool* de alto recuento celular, debido a que las células polimorfonucleares presentan actividad NADPH oxidasa en sus membranas celulares, cuya consecuencia es la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). Este radical tiene la capacidad de sacar un hidrógeno desde la molécula de AH provocando la formación de un C-macroradical que al reaccionar con oxígeno genera un macroradical peroxilo, cuya inestabilidad provoca la ruptura de esta macromolécula en dos fragmentos de masa molecular más pequeños (Fig. Nro 1) (Juránek *et al.*, 2014). Por otro lado el incremento de AH en el LS se podría relacionar con un efecto compensatorio asociado al estrés mecánico, el cual aumenta la secreción de AH (Mömberger *et al.*, 2005) y/o se podría deber a un incremento en la síntesis de cadenas más cortas (Tanimoto *et al.*, 2010). Así, se describe

(Yanagida-Suekawa *et al.*, 2013) que en situaciones de inflamación o patologías se incrementan las moléculas de AH de menor masa molecular.

Se describe en el trabajo de Tanimoto *et al.*, (2010) que las cadenas cortas del AH tienen un efecto pro-inflamatorio, pero al mismo tiempo, también se describe que estas cadenas cortas (200-230kDa) reaccionarían con radicales libres y en consecuencia tendrían actividad antioxidante y además promoverían la curación de heridas (Sudha y Rose, 2014).

Además, con la finalidad de demostrar que la viscosidad no es afectada por la concentración de proteínas, se determinó la viscosidad utilizando diferentes concentraciones de caseína disueltas en suero fisiológico (5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL y 20 mg/mL), encontrándose que el tiempo de recorrido de la esfera metálica fue de 1 segundo en todos los casos, al igual que en el suero fisiológico puro (datos no mostrados).

Finalmente, la retención de AH fue de 2,92 y 2,85 mg/mL, en los LS con alto y bajo recuento celular respectivamente, lo que refleja que los resultados obtenidos son prácticamente iguales ya que la diferencia es de 0,07 mg /mL entre ambas muestras, a pesar de que inicialmente el valor de viscosidad fue mayor en el *pool* de alto recuento celular. Estos valores indicarían que ambos *pools* poseen similares cantidades de AH de masa molecular mayor a 300 kDa, que no podrían atravesar los poros de 0,2  $\mu$ m. También Adarmes *et al.*, (2003) indica valores en equinos mestizos de  $2,11 \pm 1,04$  mg/mL y de  $2,6 \pm 1,06$  mg/mL para animales de 1,5 - 2 años y de 4 - 5 años, respectivamente en articulación metacarpo-falángica. Además, en otro trabajo encontró valores de  $1,57 \pm 0,5$  mg/mL de AH también en articulación metacarpo-falángica (Adarmes *et al.*, 2006). Finalmente describe valores de  $1,31 \pm 0,5$  para la articulación de carpo en equinos mestizos (Adarmes *et al.*, 2008). Sin embargo, en todos estos trabajos se utilizó una técnica colorimétrica que permitió determinar el contenido de glicosaminoglicanos totales y de glicosaminoglicanos sulfatados, cuya diferencia permitió calcular en forma indirecta el contenido de AH.

Por otro lado, Howard y McIlwraith (1996) describen valores de AH de 0,33 a 1,5 mg/mL sin indicar el tipo de articulación ni la metodología utilizada y en consecuencia, tanto el tipo de articulación como la metodología usada, pueden influir en los resultados.

Una interrogante que surge del trabajo se relaciona con la pureza del AH obtenido, ya que se podría pensar que parte de las proteínas se retendrían en el papel filtro, lo que sobrestimaría

los valores calculados de retención de AH. Por esto se determinó la concentración de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) en cada una de las etapas del trabajo, observándose en la tabla 2 que en el primer filtrado se recupera la mayor cantidad de proteínas, la que luego disminuye en los lavados sucesivos, siendo el comportamiento similar entre ambos grupos, obteniéndose una concentración final de proteínas de 0,3 mg/mL. Sin embargo, al comparar en el *pool* de alto recuento celular la suma total de proteínas de los filtrados y lavados (155 mg totales) con el valor de la muestra diluida (164,2 mg totales) se encontró una diferencia de 9,2 mg de proteína. Del mismo modo, en el *pool* de bajo recuento celular esta diferencia fue de 49,2 mg totales. Se especula que el origen de estas diferencias en ambos *pools* se debería a la retención de proteínas en el sistema de filtración.

Con el fin de eliminar las eventuales proteínas que pudiesen aún quedar retenidas, cada papel filtro ya pesado fue sometido a una resuspensión con 25 mL de suero fisiológico y agitación a temperatura ambiente durante 3 horas, con el fin de separar las proteínas eventualmente retenidas en el papel filtro, no encontrándose proteínas en esta resuspensión con la prueba de Lowry en ninguno de los casos. Además, los papeles fueron nuevamente secados y pesados, sin encontrar diferencias con el valor previo, lo que indicaría la ausencia de proteínas retenidas en el papel filtro. Sin duda, las técnicas colorimétricas tienen limitaciones de sensibilidad, y así en el caso específico de la prueba de Lowry su rango mínimo detectable es de 0,2 mg (Lowry *et al.*, 1951) y en consecuencia se podrían requerir otros estudios adicionales para verificar la pureza del AH.

## **CONCLUSIONES**

El método implementado en este trabajo permitió la separación de AH preformado desde el LS equino, que se determinó en forma indirecta por la diferencia de peso del papel filtro pre y post filtración.

La filtración implementada permitió la eliminación de las proteínas del LS y de cadenas de AH menores de 300 kDa. Sin embargo, hubo proteínas que no se detectaron y que posiblemente quedaron retenidas en el sistema de filtración.

No se encontró diferencia en la cantidad de AH (> 300 kDa) obtenido entre LS con alto y bajo recuento celular. Se especula que cadenas de AH de tamaño <300 kDa atraviesan el papel filtro y que se encuentran en mayor concentración en el LS de alto recuento celular.

Podría existir una relación entre el aumento de células nucleadas en el LS y el aumento de las cadenas menores de 300 kDa, que podrían constituir un marcador temprano de daño articular.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ADARMES, H.; RIVEROS, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZALEZ, E.** 2003. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulación metacarpo falángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. Archivos de Medicina Veterinaria 35:51-59.

**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. Archivos de Medicina Veterinaria 38(1): 47-52.

**ADARMES, H.; VÁSQUEZ, F.; GALLEGUILLOS, M.; GONZÁLEZ, E.** 2008. Detección de glicosaminoglicanos de la matriz del cartílago articular en el líquido sinovial de carpo equino con fractura en esquirla. Archivos de Medicina Veterinaria 40:77-81.

**AMADO, I.; VÁSQUEZ, J.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J.** 2016. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Food Chemistry 198: 54-61.

**BOETCHER, K.; KIENLE, S.; NACHTSHEIME, J.; BURGKART, R.; HUGEL, T.; LIELEG, O.** 2016. The structure and mechanical properties of articular cartilage are highly resilient towards transient dehydration. Acta Biomaterialia. 29: 180-187.

**BRANNAN, S.R.; JERRARD, D.A.** 2006. Synovial fluid analysis. The Journal of Emergency Medicine. 30: 331-339.

**BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J.; GRODZINSKY, A.J.** 2005. Articular cartilage and osteoarthritis. Instructional Course Lectures.54: 465-480.

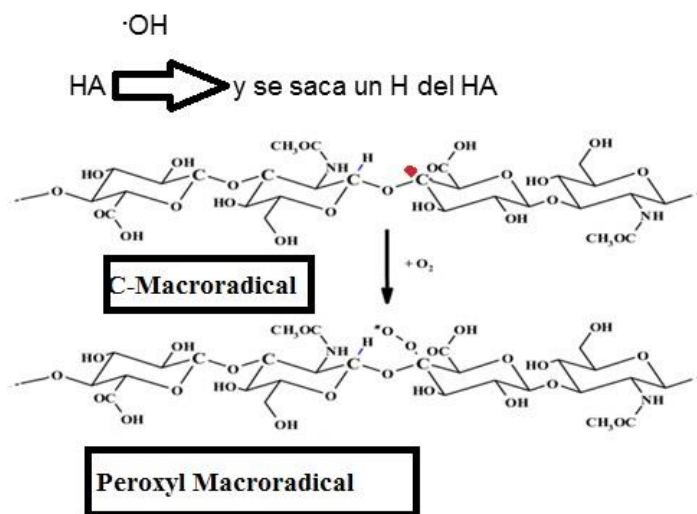
**CORRALES, L.; MUÑOZ, M.** 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. [en línea]. Nova. 10(18):213-225. <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S179424702012000200009&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S179424702012000200009&script=sci_abstract&tlng=es)> [consulta: 14 -03- 2018].

- COWMAN, M.; LEE, H-G.; SCHERTFEGER, K.; MCCARTHY, J.; TURLEY, E.** 2015. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. [en línea]. *Frontiers in Immunology*. 6: N°261: s.p. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451640/>> [consulta: 14 -07- 2017].
- FRISBIE, D.** 2012. Synovial Joint Biology and Pathobiology. In: Auer, J; Stick,J. (Eds).*Equine Surgery*. Cuarta Edicion. W.B. Saunders. St. Louise, Missouri. USA.pp 1096-1114.
- HOWARD, R.; MCLLWRAITH, C.** 1996. Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. In: Mcllwraith, C.; Trotter, G. (Eds). *Joint disease in the horse*. W.B. Saunders. USA. pp. 257-269.
- JURANEK, I.; STERN, R.; SOLTES, L.** 2014. Hyaluronan peroxidation is required for normal synovial function: An hypothesis. *Medical Hypotheses*. 82: 662-666.
- 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 Titulo Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina Veterinaria.
- LI, Z.; YAO, S.; ALINI, M.; GRAD, S.** 2007. Different response of articular chondrocyte subpopulations to surface motion. *Osteoarthritis and Cartilage*. 15: 1034-1041.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-675.
- MA, T.; LI, Y.; WANG, G.; LI, X.; JIANG, R.; SONG, X.; ZHANG, Z.; BAI, H.; LI, X.; GAO, L.** 2017. Changes on synovial fluid biomarkers after experimental equine osteoarthritis. *Journal Veterinary Research*. 61(4): 503-508.
- MÜLLER, A.; LETELIER, M.; GALLEGUILLOS, M.; MOLINA-BERRÍOS, A.; ADARMES, H.** 2010. Comparison of the antioxidant effects of synovial fluid from equine metacarpophalangeal joints with those of hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *American Journal of Veterinary Research*. 71(4): 339-404.
- MOMBERGER, T.; LEVICK, J.; MASON, R.** 2005. Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive. *Matrix Biology*. 24(8): 510-519.



- ORTVED, K.; NIXON, A.** 2016. Cell- based cartilage repair strategies in the horse. *The Veterinary Journal.* 208: 1-12.
- PENG, H.; ZHOU, J.; LIU, S.; HU, Q.; MING, J.; QUI, B.** 2010. Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes in vitro. *Inflammation Research.* 59:519-530.
- ROJAS DE LA FUENTE, C.** 2015. Determinación de Nitración de Proteínas en Tirosina en Membrana Sinovial de Articulación Metacarpofalángica de Equino como Posible Marcador de Osteoartritis en Etapa Inicial. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina Veterinaria.
- SUDHA, P.; ROSE, M.** 2014. Beneficial Effect of Hyaluronic Acid. *Advance in Foot and Nutrition Research.* 72:137-176.
- SAYLO, M.** 2006. Tema 7 Determinación de viscosidad. Base físico-químicas en el laboratorio clínico. [en línea]. <<https://sayol.files.wordpress.com/2016/01/7-determinaciones-de-viscosidad.pdf>> [consulta 20-01-2018].
- STEEL, C.** 2008. Equine Synovial Fluid Analysis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 24(2):437-454.
- TANIMOTO, K.; YANAGIDA, T.; TANNE, Y.; KAMIYA, T.; HUANG, Y.C.; MITSUYOSHI, T.; TANAKA, N.; TANAKA, E.; TANNE, K.** 2010. Modulation of Hyaluronan Fragmentation by Interleukin-1 Beta in Synovial Membrane Cells. *Annals Biomedical Engineering.* 38(4): 1618-1625.
- TODHUNTER, R.** 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. *In:* Mellwraith, C.; Trotter, G. (Eds). *Joint disease in the horse.* W.B. Saunders. USA. pp. 1- 28.
- YANAGIDA-SUEKAWA, T.; TANIMOTO, K.; TANNE, Y.; MITSUYOSHI, T.; HIROSE, N.; SU, S.; TANNE, K.; TANAKA, E.** 2013. Synthesis of hyaluronan and superficial zone protein in synovial membrane cells modulated by fluid flow. *European Journal of Oral Sciences.* 121: 566-572.
- YANG, S.; CHEN, P.; CHANG, S.; WENG, Y.; CHANG, F.; CHANG, K.; CHEN, C.; KAO, T.; HWANG, T.** 2018. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity. *Biochemical Pharmacology.* 154:384-396.

## ANEXOS



**Figura Nro. 1:** Esquema modificado de la degradación de AH por el radical hidroxilo (Juraneck et al., 2014)