

## Determinación de nitrito en suero sanguíneo y líquido sinovial de articulación carpal equina con inflamación aguda y con daño crónico reagudizado

HÉCTOR ADARMES A.<sup>1</sup>, M.V., Mg., BQ., MAURICIO QUEZADA C.<sup>1</sup>, M.V., ARNALDO CROXATTO A.<sup>2</sup>, M.V., ANDREA MÜLLER S.<sup>1</sup> M. V., y MARCO GALLEGUILLOS C.<sup>1</sup> BQ., Mg BQ.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

<sup>2</sup> Hipódromo Chile. Av. Hipódromo Chile 1715 Independencia, Santiago.

### ABSTRACT

#### NITRATE DETERMINATION IN BLOOD SERUM AND SYNOVIAL FLUID OF EQUINE CARPAL JOINT WITH ACUTE INFLAMMATION AND IN CHRONIC DAMAGE WITH INFLAMMATORY REACUTNESS

Osteoarthritis (OA) is the most common chronic joint disease in horses, with striking feature is fibrillation and loss of articular cartilage. Nitric oxide (NO<sup>•</sup>) has been implicated as an important biological mediator of OA and its production from chondrocytes is significantly higher in OA cartilage compared with that in controls. NO<sup>•</sup> shows increased content in the serum and synovial fluid with OA. Endogenously produced NO<sup>•</sup>, reduces the synthesis of cartilagenous matrix and induces chondrocytes apoptosis in articular cartilage. NO<sup>•</sup> production is indirectly determined by measuring nitrite as stable end product by Griess reaction. The purpose of this study was to compare the nitrite average in synovial fluid and blood serum between equine groups with acute and chronic with reacute inflammatory joint profiles, to establish if the coger amount of cartilage in chronic cases translates into a lower nitrite concentration in synovial fluid and serum. Synovial fluid and serum samples were obtained from equines with acute inflammatory profile of the carpal joint (n = 10), most of them with chip fracture or synovitis diagnosed by X-ray and/or clinically diagnosed, and from equines with chronic profile at the moment of obtaining the sample (n = 15). The synovial fluid protein concentration was similar in both groups and indicate inflammatory processes: 26,1 ± 6,2 g/L in acute and 25,2 ± 8,1 g/L in chronic conditions. Synovial fluid nitrite concentration showed no significant difference between these groups, and only a tendency to be higher in acute group (95,1 ± 41,4 µmol/L) compared with chronic group (75,8 ± 21,2 µmol/L). In all cases, serum nitrite concentration was higher than synovial fluid, but no significant difference was found between acute (471,4 ± 115,4 µmol/L) and chronic group (427,9 ± 101,9 µmol/L). These results suggest that loss of articular cartilage in the chronic damage group during inflammatory reacute process, do not affect synovial fluid and serum nitrite concentrations compared with acute inflammatory process.

**Key words:** Nitric oxide, equine, joint.

Proyecto DID I - 14 - 2/2001. Universidad de Chile.

Santa Rosa 11.735 La Pintana, Santiago. Fax 9785526, E-mail: mgallegu@uchile.cl, casilla 2 correo 15, Santiago.

## RESUMEN

La osteoartritis constituye la enfermedad articular crónica más frecuente en los caballos, que se caracteriza por fibrilación y pérdida de cartílago articular. El óxido nítrico (NO·) se ha considerado como un mediador biológico importante de la OA, ya que su síntesis por condrocitos de cartílago OA es mayor que los controles normales y se ha descrito, que su concentración aumenta en el suero y líquido sinovial de pacientes osteoarthríticos. El NO· reduce la síntesis de matriz cartilaginosa e induce apoptosis de condrocitos en el cartílago articular. La producción de NO· se determinó indirectamente a través del contenido de nitrito como producto final estable, utilizando la reacción de Griess. El objetivo de este estudio fue comparar la concentración promedio de nitrito en el líquido sinovial (LS) de articulación carpal y suero sanguíneo de equinos Fina Sangre de Carrera con cuadros articulares inflamatorios agudos y crónicos reagudizados, para establecer si la menor cantidad de cartílago articular en el caso de los cuadros crónicos que cursan con reagudización, se traduce en una menor concentración de nitrito, tanto en el LS como en el suero sanguíneo. Los cuadros inflamatorios agudos (n = 10) correspondieron principalmente a fractura en esquirola y/o sinovitis diagnosticada clínica y/o radiológicamente al momento de obtener la muestra, mientras que los cuadros crónicos reagudizados (n = 15) correspondieron a cuadros de enfermedad degenerativa articular diagnosticada clínica y/o radiológicamente. Con el objetivo de caracterizar la naturaleza inflamatoria de ambos cuadros clínicos, se determinó la concentración de proteínas del LS y no se encontraron diferencias significativas entre el grupo agudo ( $26,1 \pm 6,2$  mg/mL) y el crónico reagudizado ( $25,2 \pm 8,1$  mg/mL). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitrito tanto en el LS entre los grupos agudo ( $95,1 \pm 41,4$   $\mu$ mol/L) y crónico reagudizado ( $75,8 \pm 21,2$   $\mu$ mol/L) como en el suero con valores de  $471,4 \pm 115,4$   $\mu$ mol/L para el cuadro agudo y de  $427,9 \pm 101,9$   $\mu$ mol/L en el cuadro crónico reagudizado. Se encontró que el contenido de nitrito del suero sanguíneo es significativamente mayor con respecto al LS. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas en la concentración de nitrito en el LS y en el suero entre los grupos agudo y crónico reagudizado, lo que indicaría que la pérdida de cartílago en el cuadro crónico no se refleja en una menor síntesis de NO· en este caso y sugiere que la concentración de nitrito no constituye un marcador molecular de la pérdida de cartílago durante el proceso inflamatorio.

**Palabras clave:** Líquido sinovial, suero sanguíneo, nitritos.

## INTRODUCCIÓN

La cojera constituye uno de los problemas clínicos más frecuentes en los equinos de competencia, que se origina habitualmente por traumas agudos. Esta cojera puede hacerse crónica debido al deterioro del cartílago articular, junto a cambios en el hueso subcondral y de los tejidos blandos de la articulación, que caracterizan a la osteoartritis o enfermedad degenerativa articular (EDA) (McIlwraith 1996, Goldring 2000, Notoya y col, 2000, Sandell y Aigner 2001).

El trauma articular provoca ruptura celular y activación de fagocitos, fenómenos que conducen al incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS) que exacerban el daño articular iniciado por el trauma. Además, el aumento de citoquinas proinflamatorias como interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),

interferón gamma (INF $\gamma$ ) y TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), inducen la síntesis de óxido nítrico (NO·) (Bird y col., 2000) que constituye un mensajero molecular que inhibe la síntesis de proteoglicanos (Taskiran y col 1994, Goodstone y Hardingham, 2002), aumenta la actividad de metaloproteinasas en el cartílago (Murrell y col 1995), induce la apoptosis de condrocitos tanto en el cartílago (van't Hof y col., 2000) como en condrocitos aislados (Blanco y col 1995). Así el NO· participaría en la patogenia de muchas enfermedades que incluyen la EDA en especies como el hombre, el perro y el equino, debido a que es sintetizado por condrocitos y sinoviocitos como consecuencia del estímulo de las citoquinas proinflamatorias (von Rechenberg y col., 2000, Davis y col., 2001, Spreng y col., 2001, Goodstone y Hardingham, 2002, Tung y

col., 2002).

El NO $\cdot$  se sintetiza a partir de la L-arginina, por una familia de enzimas conocida como óxido nítrico sintasa (NOS) con tres isoformas, NOS-I, NOS-II y NOS-III (Moshage 1997, Clancy y col 1998, Stichtenoth y Frölich 1998; Ersoy y col 2002). La NOS-I y la NOS-III anteriormente descritas como NOS constitutivas (cNOS), actualmente se describe que su expresión puede ser modificada por diversos factores, que incluyen al ejercicio y la hipoxia, entre otros (Föstermann y col 1998). Por otro lado, la NOS-II se expresa en células estimuladas por citoquinas proinflamatorias y al no ser regulada su actividad por la concentración de Ca $^{+2}$  intracelular, produce niveles mucho más altos de NO $\cdot$  en comparación con la NOS-I y la NOS-III (Stichtenoth y Frölich 1998, Davis y col., 2001). Se ha descrito *in vitro*, que el condrocito es capaz de sintetizar NO $\cdot$  al ser inducido por citoquinas y lipopolisacáridos (Stadler y col., 1991) y que además, activa metaloproteinasas en el cartílago articular (Murrell y col., 1995).

La cuantificación de NO $\cdot$  es difícil en medios biológicos, debido a su corta vida media (de 6 a 10 segundos) y a sus bajas concentraciones. Sin embargo, se puede cuantificar a través de sus metabolitos estables: nitrito y nitrato (Moshage y col., 1995, Moshage 1997, Stichtenoth y Frölich 1998, Miranda y col., 2001, Spreng y col., 2001, Ersoy y col., 2002). El nitrito es el único producto estable resultante de la autooxidación del NO $\cdot$  en soluciones acuosas como líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial. El nitrato en cambio, se forma por la reacción entre el NO $\cdot$  y la oxihemoglobina, lo que implica que el nitrato existe en mayor proporción en plasma y suero. Se ha establecido una alta correlación entre la producción de NO $\cdot$  y los niveles de nitrato o nitrito en plasma, suero y orina, y su medición permitiría estimar la producción real de NO $\cdot$  *in vivo* (Stichtenoth y Frölich 1998, Miranda y col., 2001, Ersoy y col., 2002).

Se han encontrado altos niveles de nitrito + nitrato en el suero y en el líquido sinovial de pacientes humanos con artritis reumatoidea (RA), EDA y en animales con EDA inducida experimentalmente o con artritis autoinmune (Ersoy y col., 2002). Además, se encontró que el nitrito está más concentrado en el líquido sinovial que en el suero, lo que indicaría la síntesis intraarticular de NO $\cdot$  (Stichtenoth y Frölich 1998). En

ratas osteoartríticas se ha visto incremento de la expresión de NOS II y del contenido de nitrito (Grabowsky y col., 1997, Castro y col., 2006). Un resultado similar se observó en condrocitos osteoartríticos humanos sometidos a estrés mecánico (Lee y col 2002).

En este estudio se intentó establecer si la concentración de nitrito del líquido sinovial tiene relación con la concentración en suero sanguíneo de equinos, utilizando un modelo articular inflamatorio *in vivo* y espontáneo. Se busca establecer si la eventual alteración del cartílago en el cuadro crónico reagudizado, disminuye la concentración de nitrito tanto en el líquido sinovial como en el suero equino (van't Hof y col., 2000, Kim y col., 2003), comparado con el cuadro agudo sin antecedentes de EDA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Material Biológico.** Se obtuvo sangre sin anticoagulante por venipuntura yugular y líquido sinovial (LS) por artrocentesis aséptica, previa a la artroscopía, tanto de carpo con inflamación aguda como de carpo con daño crónico reagudizado, de equinos FSC del Hipódromo Chile. Los cuadros agudos correspondieron a sinovitis y/o fracturas en esquirola (n = 10), sin antecedentes anamnésticos de lesión previa ni signos radiológicos compatibles con cuadros crónicos, al momento de obtener la muestra. Los casos de daño crónico con reagudización (n = 15) incluyeron principalmente cuadros de EDA reagudizados de carpo, diagnosticados radiológicamente y también algunos animales que sin tener un diagnóstico radiológico, poseían antecedentes clínicos de cronicidad del cuadro.

Las muestras de suero y de líquido sinovial se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron alicuotados y conservados a -20°C hasta su procesamiento.

**Determinación de proteínas.** En los sobrenadantes de las muestras de suero sanguíneo y de LS, se determinó la concentración de proteínas por el método espectrofotométrico de Lowry y col (1951) utilizando seroalbúmina de bovino (BSA) como estándar. El objetivo de establecer la concentración de proteínas en el líquido sinovial se relaciona con caracterizar el proceso inflamatorio (Adarques y col., 2008) y además,

para ambas muestras, verificar la ausencia de proteínas posterior a la dilución con etanol, en la determinación de nitrito.

**Determinación de nitrito.** En las muestras de LS y suero sanguíneo se determinó la concentración de nitrito utilizando la reacción de Griess (Miranda y col 2001), que detecta específicamente nitrito y no nitrato (Moshage y col., 1995, Moshage 1997, Miranda y col., 2001). Dicha reacción se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sufanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminos bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro.

Sin embargo, esta reacción se podría afectar por las proteínas del medio y por eso, las muestras de LS y suero se desproteinizaron (Miranda y col., 2001) por dilución 1:7 con etanol. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a  $1.700 \times g$  durante 15 minutos y se determinó la ausencia de proteínas en el sobrenadante por el método de Lowry y col., (1951).

A  $300 \mu\text{L}$  de sobrenadante desproteinizado se agregó  $300 \mu\text{L}$  de agua destilada y  $300 \mu\text{L}$  del reactivo de Griess, el cual se preparó usando una relación 1:1 de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (NEDD) 0,1% p/v, y sulfanilamida (SULF) 2% p/v, en HCl al 5%. Esta mezcla se homogeneizó e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se determinó su absorbancia a 540 nm. Se preparó una curva estándar con  $\text{NaNO}_2$  0,1 mM en volúmenes desde 9 hasta  $100 \mu\text{L}$  (entre  $0,069 \mu\text{g}$  y  $0,69 \mu\text{g}$  de  $\text{NaNO}_2$ ) utilizando como blanco agua destilada y reactivo de Griess. La concentración se expresó como  $\mu\text{moles}$  de nitrito/L.

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las edades de los ejemplares fueron similares para ambos grupos, según los registros del Hipódromo. Así, la edad para el grupo agudo ( $n = 10$ ) fue  $3,8 \pm 1,1$  años y para el grupo crónico

reagudizado ( $n = 15$ ) fue  $4,6 \pm 1,6$  años (Tabla 1). Este antecedente se debe considerar, puesto que se ha descrito la disminución de la síntesis de  $\text{NO}\cdot$  por los condrocitos a través de la edad (van der Harst y col., 2006).

La concentración de proteínas en el LS del cuadro agudo fue  $26,1 \pm 6,6 \text{ g/L}$ , mientras que en el cuadro crónico reagudizado fue  $25,2 \pm 8,1 \text{ g/L}$ , antecedente que indicaría la naturaleza inflamatoria de ambas condiciones (Tabla 1). Estos valores coinciden con lo detectado Adarmes y col. (2008), para cuadros de fractura en esquirola en equinos FSC del Hipódromo Chile y son mayores a los detectados en carpo macroscópicamente normal de equinos de matadero, utilizando la misma técnica espectrofotométrica en que se obtuvo una concentración de proteínas de  $9,05 \pm 5,1 \text{ g/L}$  (Adarmes y col., 2008).

Al comparar la concentración de nitrito de LS de carpo equino en ambas condiciones clínicas, no muestran diferencias significativas, con valores promedio de  $95,1 \pm 41,4 \mu\text{mol/L}$  para el grupo agudo y de  $75,8 \pm 21,2 \mu\text{mol/L}$  para el grupo crónico reagudizado (Tabla 1). Sólo se aprecia una tendencia a la disminución del contenido de nitrito en el grupo crónico reagudizado con respecto al grupo agudo, lo que podría estar relacionado con la pérdida de cartílago y por ende, de condrocitos responsables de la mayor producción de  $\text{NO}\cdot$  en la articulación (Studler y col., 1999). Se indica que los condrocitos de la capa superficial del cartílago constituyen una fuente importante de  $\text{NO}\cdot$  (Hayashi y col., 1997), y por lo tanto, serían los más afectados por el daño del cartílago. Además, el incremento de  $\text{NO}\cdot$  se relaciona con un incremento de la apoptosis de condrocitos en cartílagos osteoartríticos de equinos (Kim y col., 2003). Sin embargo, por otro lado se plantea que tanto el cartílago como los condrocitos obtenidos de articulaciones con OA, son las que producen mayor cantidad de  $\text{NO}\cdot$ . Posiblemente en esos estudios *in vitro*, al considerar cantidades equivalentes de cartílago o de condrocitos para realizar la comparación entre el cartílago normal y el osteoartrítico, no se reflejaría la síntesis total de  $\text{NO}\cdot$  en la articulación como ocurre en este estudio *in vivo*. Otro factor que podría influir corresponde a la edad de los ejemplares, ya que se ha descrito que la concentración de nitrito se incrementa significativamente en cartílago y hueso subcondral de caballos jóvenes comparado con caballos maduros (van der Harst y col., 2006).

**Tabla 1. Edad promedio de los grupos analizados con su respectivo tamaño muestral. Concentración de proteínas (mg/mL) y de nitrito ( $\mu\text{mol/L}$ ) en el líquido sinovial de la articulación carpal equina y en el suero sanguíneo de los mismos animales. Average age of analyzed groups with its. Protein (mg/mL) and nitrite ( $\mu\text{mol/L}$ ) concentrations in synovial fluid of equine carpal joint and serum of the same animals**

Grupos	n	Edad Promedio (años)	Proteínas mg/mL		Nitrito $\mu\text{mol/L}$	
			LS	LS	Suero	
Agudo	10	3,8 $\pm$ 1,1	26,1 $\pm$ 6,6	95,1 $\pm$ 41,4	471,4 $\pm$ 115,4	
Crónico						
Reagudizado	15	4,6 $\pm$ 1,6	25,2 $\pm$ 8,1	75,8 $\pm$ 21,2	427,9 $\pm$ 101,9	

Para descartar el efecto de la edad, en este trabajo se seleccionaron ejemplares de edades similares.

A diferencia de lo descrito por Stichtenoth y Frölich (1998), se encontró que la concentración de nitrito fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el suero con respecto al líquido sinovial. Posiblemente esta discrepancia se podría asociar a que los mediadores proinflamatorios como la IL-1 $\beta$ , podrían ejercer su acción no sólo en la articulación afectada, sino que podrían estimular la actividad de la iNOSII en otros tejidos extraarticulares. Sin embargo, la concentración de nitrito sérico no demostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos agudo (471,4  $\pm$  115,4  $\mu\text{mol/L}$ ), y el crónico reagudizado (427,9  $\pm$  101,9  $\mu\text{mol/L}$ ) (Tabla 1). Entre el grupo agudo y el crónico reagudizado se aprecia una tendencia semejante a la observada en el líquido sinovial. La ausencia de diferencias significativas en la concentración de nitrito, tanto en el líquido sinovial como en el suero sanguíneo entre ambos grupos analizados, permitiría concluir que esta variable analizada no constituiría un predictor adecuado del daño del cartilago en el proceso osteoartítico durante su reagudización inflamatoria.

## REFERENCIAS

- ADARMES H, VÁSQUEZ F, GALLEGUILLOS, M, GONZÁLEZ E. 2008. Detección de glicosaminoglicanos de la matriz del cartilago articular en el líquido sinovial de carpo equino con fractura en esquirra. Arch Med Vet 40: 77-81.
- BIRD JLE, MAY S, BAYLISS MT. 2000. Nitric oxide inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. Equine Vet J 32: 133-139.
- BLANCO FJ, OCHS RL, SCHWARZ RL, LOTZ M. 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. Am J Pathol 146: 75-85.
- CASTRO RR, CUNHA FG, SILVA FS, ROCHA FAC. 2006. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis-evidence of a role for nitric oxide. Osteoarthritis Cartilage 14: 769-776.
- CLANCY RM, AMIN AR, ABRAMSON SB. 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis Rheum 2: 1141-1151.
- DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F. 2001. Novel Effects of nitric oxide. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 203-236.
- ERSOY Y, ÖZEROL E, BAYSAL Ö, TEMEL I, MACWALTER RS, MERAL Ü, ALTAY ZE. 2002. Serum nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. Ann Rheum Dis 61: 76-78.
- FÖRSTERMANN U, BOISSEL J, KLEINERT H. 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS II). Faseb J 12: 773-790.
- GOLDRING MB. 2000. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum 43: 1916-1926.
- GOODSTONE NJ, HARDINGHAM TE. 2002. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates nitric oxide production more potently than interleukin 1- $\beta$  in porcine articular chondrocytes. Rheumatology 41: 883-891.
- GRABOWSKI PS, WRIGTH PK, VAN'T HOF RJ, HELFRICH MH, OSHIMA H, RALSTON SH. 1997. Immunolocalization of inducible nitric oxide sintase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Br J Rheumatol 36: 651-655.
- HAYASHI T, ABE E, YAMATE T, TAGUCHI Y, JASIN HE. 1997. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. Arthritis Rheum 40: 261-269.
- HÉRAUD F, HERAÚD A, HARMAND M-F. 2000. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Ann Rheum Dis 59: 959-965.
- INFOSTAT. 2004. Infostat, versión 2004. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- KIM DY, TAYLOR HW, MOORE RM, PAULSEN DB, CHO D-Y. 2003. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. Vet J 166: 52-57.
- LEE MS, TRINDALE MCD, IKENOUE T, SCHURMAN DJ, GOODMAN SB, SMITH RL. 2002. Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. J Orthop Res 20: 556-561.



- 17.- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- 18.- MCILWRAITH CW. 1996. General pathobiology of the joint and response to injure. In: Mellwraight CW, Trotter GW. *Joint disease in the horse*. WB Saunders, Philadelphia, USA. Pp. 40-70.
- 19.- MIRANDA KM, ESPEY MG, WINK DA. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5: 62-71.
- 20.- MOSHAGE H, KOK B, HUIZENGA JR, JANSEN PLM. 1995. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 41: 892-896.
- 21.- MOSHAGE H. 1997. Nitric Oxide Determinations: Much Ado About NO - Thing? *Clin Chem* 43: 553-556.
- 22.- MURRELL GAC, JANG D, WILLIAMS RJ. 1995. Nitric oxide activates metalloproteinase enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 15-21.
- 23.- NOTOYA K, JOVANOVIC DV, REBOUL P, MARTEL-PELLETIER J, MINEAU F, PELLETIER JP. 2000. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E<sub>2</sub> via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 165: 3402-3410.
- 24.- SANDELL LJ, AIGNER T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3: 107-113.
- 25.- SPRENG D, SIGRIST N, SCHWEIGHAUSER A, BUSATO A, SCHAWALDER P. 2001. Endogenous Nitric Oxide Production in Canine Osteoarthritis: Detection in urine, serum and synovial fluid specimens. *Vet Surg* 30: 191-199.
- 26.- STADLER J, STEFANOVIC-RACIC M, BILLIAR TR, CURRAN RD, MCINTYRE LA, GEORGESCU HI, SIMMONDS RL, EVANS CH. 1991. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 147: 3915-3920.
- 27.- STUDER R, JAFFURS D, STEFANOVIC-RACIC M, ROBBINS PD, EVANS CH. 1999. Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 377-379.
- 28.- STICHTENOTH DO, FRÖLICH JC. 1998. Nitric oxide and inflammatory joint disease. *Br J Rheumatol* 37: 146-257.
- 29.- 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.
- 30.- TOMITA M, SATO EF, NISHIKAWA M, YAMANO Y, INOUE M. 2001. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 44: 96-104.
- 31.- TUNG JT, VENTA J, CARON JO. 2002. Inducible nitric oxide expression in equine articular chondrocytes: effects of antiinflammatory compounds. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 5-12.
- 32.- VAN DER HARST M, BULL S, BRAMA PA, BARNEVELD AB, VAN WEEREN PR, VAN DE LEST C. 2006. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. *J Rheumatol* 33: 1662-1667.
- 33.- VAN'T HOF RJ, HOCKING L, WRIGHT PK, RALSTON SH. 2000. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology* 39: 1004-1008.
- 34.- VON RECHENBERG B, MCILWRAITH CW, AKENS MK, FRISBIE DD, LEUTENEGGER C, AUER JA. 2000. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet J* 32: 140-150.