

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CITOLÓGICAS DO LÍQUIDO SINOVIAL DE PÔNEIS COM MODELO DE SINOVITE INDUZIDA

RICARDO POZZOBON,¹ KARIN ERICA BRASS,² RAFAEL ALMEIDA FIGHERA³ E FLÁVIO DESSESSARDS DE LA CORTE⁴

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM. E-mail: ricardopozzobon@yahoo.com.br

2. Clínica de Equinos, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM

3. Patologia Veterinária, UFSM

4. Clínica de Equinos, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever as principais alterações do líquido sinovial de seis pôneis com sinovite induzida através da administração intra-articular de 0,5 mL de adjuvante completo de Freund. As características físico-químicas e citológicas foram avaliadas antes da indução da sinovite (T0), cinco dias pós-indução (T1) e, a partir daí, às 12 (T2), 24 (T3), 48 (T4), 72 (T5), 96 (T6) e 120 horas (T7). A articulação contralateral sadia serviu como controle. A proteína, a viscosidade e a qualidade da precipitação da mucina não diferiram ($P>0,05$) entre as articulações em T0. Em T1, o líquido sinovial das articulações com sinovite apresentou aumento da concentração de proteína (6,5 g/dL), baixa viscosidade e baixa qualidade do precipitado da mucina, resultados que permaneceram estáveis até T7. Nas

articulações sadias não foi observada diferença na viscosidade e qualidade da mucina até o final do experimento, mas, devido às artrocenteses, a proteína aumentou ($p<0,05$) em T6 e T7. Nas articulações induzidas houve aumento acentuado ($p<0,05$) de células nucleadas (>700 células/mm³) em T1, com decréscimo em T3, mas permanecendo em níveis considerados inflamatórios durante todo tempo de observação. A contagem diferencial revelou predominância de neutrófilos e presença de células mesoteliais reativas. A infiltração intra-articular com 0,5 mL de adjuvante completo de Freund produz uma sinovite neutrofílica de intensidade moderada a grave, semelhante à sinovite de ocorrência natural, reforçando a eficácia desse modelo para o estudo da patofisiologia e tratamento de doenças articulares.

PALAVRAS-CHAVES: Articulação, equino, líquido sinovial, sinovite.

ABSTRACT

PHYSICAL, BIOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SYNOVIAL FLUID WITH INDUCED SYNOVITIS MODEL IN PONIES

The aim of this study was to describe the changes of the synovial fluid caused by experimental synovitis induced by an intra-articular injection of 0.5 mL of Freund's complete adjuvant in six adult ponies. The physical-chemical and cytological parameters were evaluated before the synovitis induction (T0), 5 days after induction (T1) and, after that, at 12 (T2), 24 (T3), 48 (T4), 72 (T5), 96 (T6) and 120 hours (T7). The contra lateral joint served as healthy control. The protein, viscosity and mucin precipitation quality did not differ ($P>0.05$) among the joints in T0. At T1, the synovial

fluid of the joints with synovitis showed an increased protein concentration (6.5 g/dL), low viscosity and low mucin precipitate quality, which remained stable until T7. Viscosity and mucin precipitate quality did not change in the synovial fluid of healthy joints until the end of the experiment. Due to repeated arthrocentesis, protein increased ($p < 0.05$) at T6 and T7. Joints with synovitis had an increased total nucleated cell count (>700 cells/mm³, $p < 0.05$) at T1, that decreased at T3, remaining on an inflammatory level during the observation period. The differential cell count

showed neutrophil predominance and presence of reactive mesothelial cells. The intra-articular injection of 0.5 mL of Freund's complete adjuvant produced a neutrophilic synovitis of moderate to severe intensity, similar to the

natural synovitis, reinforcing the effectiveness of this model in the study of the pathophysiology and treatment of joint diseases.

KEY WORDS: Equine orthopedics, synovitis, synovial fluid.

INTRODUÇÃO

O modelo de carpite induzida através da administração intra-articular de adjuvante completo de Freund é um modelo consistente de sinovite equina e doença articular degenerativa. Esse modelo tem sido usado para estabelecer ou confirmar a dose e a eficácia de muitos medicamentos utilizados no tratamento de doença articular equina (WHITE, 1994). O modelo produz uma sinovite que, se não tratada, resultará em doença degenerativa detectável radiograficamente em três a seis semanas. Os equinos submetidos a esse modelo continuam se alimentando normalmente. Além disso, os resultados de estudos que utilizaram esse modelo têm sido equivalentes aos encontrados em situações clínicas de campo (HAMM et al., 1984; WHITE, 1994), o que promove um importante efeito na confiabilidade de tratamentos médicos para doença articular equina (WHITE et al., 1996).

Apesar de haver muitas variações no líquido sinovial inflamado, elas não são muito descritas, principalmente quando utilizados modelos de sinovite induzida. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi descrever as características do líquido sinovial de pôneis com um modelo de sinovite induzida através da administração intra-articular do adjuvante completo de Freund.

MATERIAL E MÉTODOS

Submeteram-se seis pôneis machos inteiros, clinicamente sadios, com idade entre dois e três anos e pesando, em média, 130 kg, a exame clínico geral e radiográfico do carpo para descartar a presença de doença sistêmica ou articular.

Após a avaliação clínica, cada pônei foi sedado com xilazina^a a 10% (0,5 mg/kg)

e realizou-se antissepsia, com iodo povidine seguido de álcool, de ambas as articulações carpais previamente tricotomizadas. De cada articulação radiocarpiana colheu-se uma amostra de líquido sinovial por meio de uma agulha 20 x 7 mm e seringa de 5 mL. Após, transferiu-se o líquido para um tubo com EDTA. As características do líquido sinovial obtidas foram tabuladas e usadas como referência (T0). Por ocasião da artrocentese infiltraram-se, aleatoriamente, 0,5 mL de adjuvante completo de Freund^b na articulação radiocarpiana esquerda ou direita de cada pônei para indução da sinovite (WHITE et al., 1996). A articulação contralateral sadia serviu como controle.

Avaliaram-se a aparência, a cor e o volume do líquido sinovial no momento da artrocentese. A análise do fluido sinovial foi realizada através da contagem de células nucleadas totais, da mensuração da proteína e da avaliação da qualidade do precipitado da mucina e da viscosidade relativa. Procedeu-se à determinação da qualidade do precipitado da mucina segundo VAN PELT (1974) e McILWRAITH & TROTTER (1996). Conforme a coagulação do precipitado, classificou-se a qualidade da mucina em muito boa (1), razoável (2), baixa (3) ou muito baixa (4). A viscosidade relativa foi avaliada mediante a união e separação do líquido entre os dedos, sendo também classificada de 1 a 4, como descrito anteriormente. Determinou-se a proteína por meio de refratometria. A contagem das células nucleadas totais foi realizada usando câmara de Neubauer, tendo água destilada como diluente. Para análise citológica, o líquido foi centrifugado e o sedimento utilizado para confecção do esfregaço, sendo este posteriormente corado pelo método panótico rápido para contagem diferencial de células (MAHAFFEY, 1992; McILWRAITH & TROTTER, 1996) e avaliação do grau de eritrofagocitose.

Realizou-se a avaliação das características do líquido sinovial antes da indução da sinovite (T0), 5 dias pós-indução (T1) e, a partir daí, às 12 (T2), 24 (T3), 48 (T4), 72 (T5), 96 (T6) e 120 horas (T7). O fluido sinovial foi colhido alternadamente entre o aspecto dorsolateral e dorsomedial das articulações radiocarpianas.

Analisaram-se os dados do fluido sinovial em fatorial com dois grupos de articulações (sadia e com sinovite induzida) e oito tempos (T0 – T7). Para análise estatística dos dados, foi realizada análise de variância das médias (ANOVA), seguida do teste Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o pacote estatístico SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aparência do líquido sinovial foi avaliada macroscopicamente no momento da punção articular. O líquido sinovial obtido na artrocentese de todas as articulações sadias no início do experimento (antes da indução de sinovite) e nos controles (articulações sadias) apresentou cor amarelo-palha, sem turvação e boa viscosidade. As características macroscópicas são consideradas fisiológicas, de acordo com McILWRAITH & TROTTER (1996). A presença de opacidade e de algum material coagulado nas amostras obtidas das articulações cinco dias após a administração do adjuvante completo de Freund foi considerada indicativa de sinovite, sendo observada durante todo o período de avaliação. A turvação do líquido sinovial é causada pela elevação na concentração de proteína e pelo aumento da celularidade (McILWRAITH & TROTTER, 1996). As alterações marcantes das características macroscópicas do líquido sinovial observadas neste estudo são comuns em sinovite aguda de origem traumática. Já na doença degenerativa crônica e na osteocondrite dissecante essas alterações, geralmente, são mínimas (McILWRAITH & TROTTER, 1996).

Para a contagem das células nucleadas, foi utilizada água destilada como diluente, pois o ácido acético, diluente normalmente utilizado, precipita com o ácido hialurônico do líquido sinovial (MAHAFFEY, 1992). Não houve variação no número total de células nucleadas entre as

articulações antes da indução da sinovite (T0). No quinto dia após a indução (T1), observou-se aumento significativo no número de células nucleadas nas articulações com sinovite induzida, chegando a mais de 7000 células/mm³ (Figura 1). Essa celularidade permaneceu elevada até 12 horas (T2) do quinto dia, diminuindo a partir desse momento. O aumento significativo das células nucleadas para mais de 500 células/mm³ nas articulações com sinovite confirma a ocorrência de inflamação (MAHAFFEY, 1992; McILWRAITH & TROTTER, 1996). Apesar de posteriormente se observar uma queda (3000 a 5000 células/mm³) na celularidade, esta permaneceu sem diferença estatística.

O número de células nucleadas no fluido sinovial de cavalos sadios varia entre 87 e 167 células/mm³. Mudanças qualitativas e quantitativas nos leucócitos indicam a magnitude da inflamação da membrana sinovial (McILWRAITH & TROTTER, 1996). Em artrite não infecciosa, a contagem de células nucleadas totais geralmente é inferior a 30.000 células/mm³, como a encontrada neste estudo, mas valores maiores que 100.000 células/mm³ podem ocorrer em artrite imunomediada, induzida por endotoxina, e em artrite reativa (BERTONE, 2003).

Na contagem diferencial de células do líquido sinovial, não houve diferença entre as articulações em T0, sendo a percentagem média de neutrófilos das articulações de 8,4%. A percentagem de neutrófilos (Figura 1) diferiu entre as articulações sadias e com sinovite e entre os tempos de coleta ($p < 0,05$). Cinco dias após a indução da sinovite (T1), constatou-se aumento da percentagem de neutrófilos no líquido inflamado, mantendo-se sem variação até T6, com diminuição em T7. Tanto neutrófilos como células mononucleares são observados no líquido sinovial sadio, mas a percentagem de neutrófilos geralmente é inferior a 10% (McILWRAITH & TROTTER, 1996). Os neutrófilos são, geralmente, as células predominantes no líquido sinovial de cavalos com doença inflamatória (MAHAFFEY, 1992).

Neste trabalho, a percentagem de neutrófilos das articulações com sinovite se manteve acima de 80% até nove dias após a indução da sinovite

(T5), caindo para menos de 60% no dia seguinte (T6). Os neutrófilos lesam os tecidos, pois liberam enzimas destrutivas e alteram o meio do líquido sinovial (McILWRAITH & TROTTER, 1996). Nas articulações saudias, a percentagem de neutrófilos foi aumentando no decorrer das artrocenteses, permanecendo semelhante à das articulações com sinovite induzida entre T3 e T5. Esse aumento pode ser atribuído à hemorragia articular causada pelo trauma das artrocenteses repetidas, pois na hemartrose ocorre exsudação neutrofílica (MAHAFFEY, 1992). No final (T6 e T7) esses valores retornaram para valores fisiológicos.

A percentagem de macrófagos (Figura 1), assim como nos neutrófilos, diferiu entre as articulações saudias e com sinovite e entre os tempos de coleta ($p < 0,05$). No líquido sinovial das articulações saudias, a percentagem de macrófagos se manteve mais elevada ($p < 0,05$) do que no das articulações com sinovite durante todo o experimento, apresentando aumento significativo ($p < 0,05$) em T1 e T7. Nas articulações com sinovite induzida não houve variação na maioria dos tempos de coleta. A exceção do aumento significativo foi observada em T7. As células mononucleares encontradas no líquido sinovial são linfócitos, macrófagos e células mesoteliais (MAHAFFEY, 1992). Neste trabalho, a porcentagem de macrófagos do líquido sinovial das articulações saudias se manteve em média acima de 50%, e em alguns momentos (T1 e T7) chegou a 80%, tratando-se de células predominantes no líquido sinovial sadio (MAHAFFEY, 1992). Nas articulações com sinovite induzida, o número de macrófagos se manteve baixo, aumentando somente em T7 (48,5%).

A percentagem de linfócitos não variou entre as articulações saudias e com sinovite durante todo período de experimento. A média variou entre 15,9% (T0) e 1,2% (T2) em todas as articulações avaliadas, percentagem considerada fisiológica (MAHAFFEY, 1992). O mesmo foi observado na percentagem de eosinófilos, mantendo-se entre 2,3% (T0) e 0,08% (T2). A proporção de macrófagos e linfócitos raramente fornece informação diagnóstica útil, e sinovite linfocítica é rara em equinos (MAHAFFEY, 1992). A percentagem de eosinófilos é, geralmente, inferior a 1% do total de

células nucleadas (MAHAFFEY, 1992). A sinovite eosinofílica é rara, podendo ocorrer como reação alérgica a um produto injetado na articulação, em virtude da migração de parasitas ou pode ser idiopática (BERTONE, 2003).

A presença de eritrócitos variou bastante, tanto nas amostras obtidas das articulações saudias quanto nas com sinovite induzida. Apesar de se alternar o local da artrocentese entre o aspecto dorso-medial e dorsolateral, para minimizar o trauma e, conseqüentemente, a hemorragia iatrogênica no espaço articular, foi observado um aumento progressivo no número de eritrócitos. Eritrócitos não são considerados constituintes normais do líquido sinovial. Quando encontrados em pequeno número são atribuídos à contaminação da amostra no momento da artrocentese. A contagem de eritrócitos pode variar muito, dependendo da contaminação durante a artrocentese (McILWRAITH & TROTTER, 1996) e do trauma resultante de artrocenteses repetidas (TODHUNTER & LUST, 1992).

Uma indicação de contaminação no momento da coleta é a presença de plaquetas no exame citológico. A fagocitose de eritrócitos por macrófagos em uma amostra recentemente colhida e processada sugere que os eritrócitos já estavam no líquido no momento da colheita (MAHAFFEY, 1992). No caso de traumatismo recente pode haver hemorragia articular significativa. Outras causas de hemorragia articular incluem alterações na coagulação e neoplasmas (FISHER, 2003). Observou-se eritrofagocitose (Figura 1) a partir da segunda artrocentese, tanto nas articulações saudias quanto nas com sinovite, não se notando diferença entre as articulações. Ela foi atribuída a trauma, causando infiltração de eritrócitos no líquido sinovial. Por esse motivo, não se realizou a contagem de eritrócitos no fluido sinovial.

Células mesoteliais foram observadas a partir de T1 (Figura 1) em todas as articulações, sendo algumas reativas, exibindo borda citoplasmática com projeções, no líquido sinovial das articulações com sinovite induzida. As células mesoteliais diferiram entre as articulações saudias e com sinovite e entre tempos. O maior aumento foi registrado nas articulações saudias em T2 (2,6%), permanecendo estáveis durante o resto do experimento. Células

intactas de revestimento sinovial são ocasionalmente aspiradas (MAHAFFEY, 1992). Trata-se de células que se tornam facilmente reativas quando há aumento de líquido em cavidades corporais ou

processos inflamatórios (SHELLY, 2003), e foram observadas no líquido sinovial das articulações com sinovite.

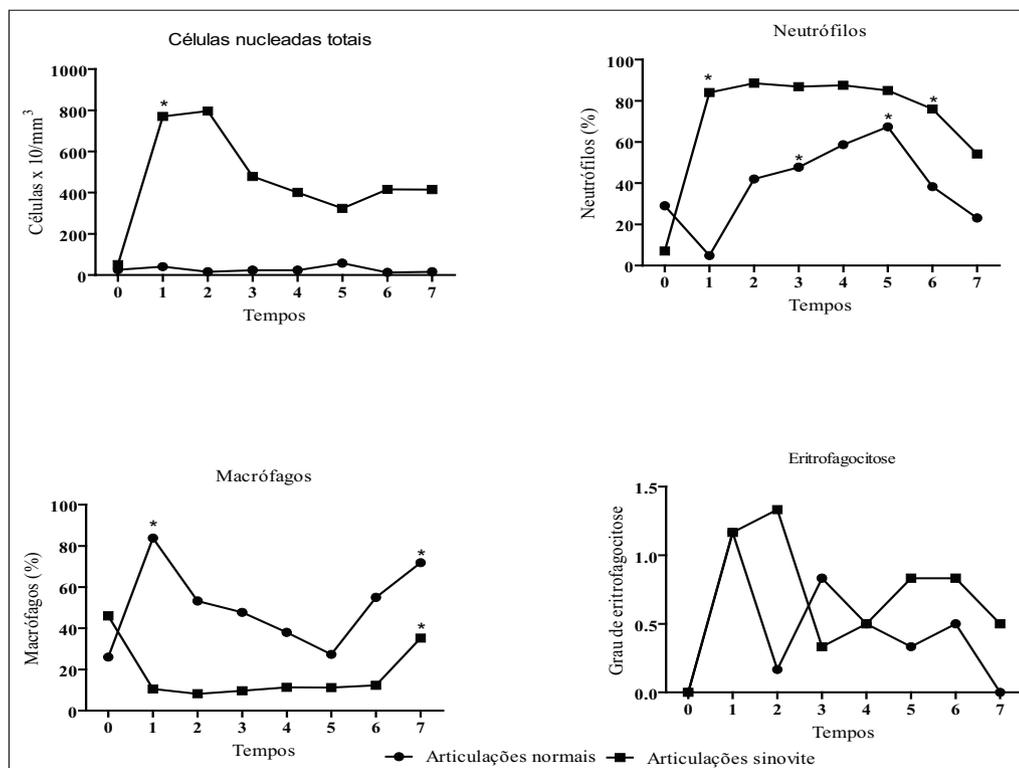


FIGURA 1. Valores médios das células nucleadas totais, neutrófilos, macrófagos e grau de eritrofagocitose do líquido sinovial das articulações radiocarpianas com sinovite induzida (quadros pretos) e normais (círculos pretos) de pôneis. (* diferença entre os grupos e entre os tempos).

Concentração de proteína (Figura 1), viscosidade (Figura 1) e precipitação da mucina (Figura 1) não diferiram ($P > 0,05$) entre as articulações em T0. Essas variáveis aumentaram nas articulações com sinovite induzida em T1, permanecendo elevadas até 120 horas (T7). Nas articulações saudáveis, não se notou variação da viscosidade e da precipitação da mucina até o final do experimento, mas a proteína aumentou significativamente ($p < 0,05$) em T5 e T6. A artrocentese repetida não modificou a viscosidade e qualidade da precipitação da mucina nas articulações saudáveis, no decorrer do experimento.

O teste da qualidade do precipitado da mucina e de viscosidade é um método semiquantitativo que avalia o grau de polimerização do ácido hialurônico no líquido sinovial (MAHAFFEY, 1992).

Quanto mais inflamada a articulação, menor será a coagulação da mucina. Isto ocorre porque há diluição e redução na produção do ácido hialurônico, diminuindo a viscosidade do líquido sinovial e a lubrificação dos tecidos articulares. Quando o processo inflamatório aumenta, há diminuição da produção de ácido hialurônico e aumento de sua degradação pelas enzimas lisossomais (BERTONE, 2003). Mucina de qualidade boa ou razoável é associada com artrite traumática ou degenerativa, enquanto que mucina de qualidade baixa ou muito baixa geralmente é resultante de artrite séptica. Entretanto, a correlação não é muito forte, porque mucina de baixa qualidade tem sido observada na presença de inflamação moderada (McILWRAITH & TROTTER, 1996). Por esse motivo, o teste da qualidade do precipitado da mucina não

é rotineiramente utilizado (MAHAFFEY, 1992; McILWRAITH & TROTTER, 1996).

As proteínas totais aumentaram de aproximadamente 2 g/dL para até 7 g/dL na sinovite induzida, atingindo níveis semelhantes aos encontrados por WHITE et al. (1996), usando o mesmo modelo de sinovite. O aumento da permeabilidade capilar, que ocorre durante o processo inflamatório da articulação, e as artrocenteses repetidas permitem que proteínas com peso molecular elevado, principalmente globulinas, penetrem no espaço articular, resultando em uma concentração de proteína próxima à do plasma (VAN PELT, 1974).

A quantidade relativa de albumina do líquido sinovial inflamado diminui, enquanto que as alfa 2 e gamaglobulinas aumentam (McILWRAITH & TROTTER, 1996). O líquido sinovial é

considerado alterado quando a proteína total for superior a 2,5 g/dL. Já proteína acima de 4 g/dl, como a observada nas articulações com sinovite induzida, indica inflamação grave (McILWRAITH & TROTTER, 1996). O aumento de proteína no líquido sinovial observado nos pôneis deste estudo, além de ser causado pela inflamação induzida pelo adjuvante, também pode ser atribuído, em parte, à resposta inflamatória desencadeada pelas artrocenteses repetidas (CAMPBELL et al., 2004). Um aumento discreto da proteína, porém estatisticamente significativo, foi observado no líquido sinovial das articulações saudáveis. Portanto, as artrocenteses repetidas contribuíram para o aumento da concentração de proteínas no líquido sinovial de ambas as articulações, saudáveis e com sinovite induzida.

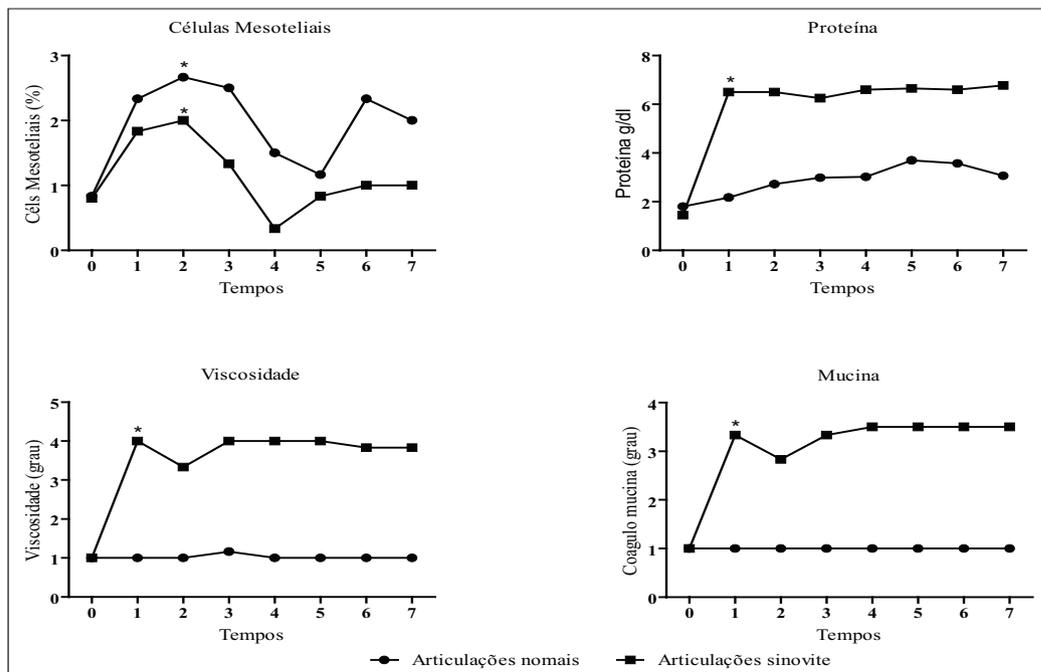


FIGURA 2. Valores médios das células mesoteliais, da proteína, grau de viscosidade e qualidade do coagulo da mucina do líquido sinovial das articulações radiocarpianas com sinovite induzida (quadrados pretos) e normais (círculos pretos) de pôneis. (* diferença entre os grupos e entre os tempos).

CONCLUSÃO

A infiltração intra-articular com 0,5 mL de adjuvante completo de Freund induz uma sinovite neutrofílica de intensidade moderada a grave, com

elevada quantidade de proteínas e viscosidade bastante diminuída. Essas características são semelhantes a uma sinovite ocorrida naturalmente, demonstrando a eficácia desse modelo para o estudo da patofisiologia e tratamento de doenças articulares.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a. Sedomin, König do Brasil Ltda.
- b. Ajuvante completo de Freund, F5881. Sigma – Aldrich.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria. Protocolo nº. 23081.000.229/2007-71.

REFERÊNCIAS

- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid inflammatory mediators as markers of equine synovitis. **Veterinary Surgery**, v. 22, p. 372-405, 1993.
- BERTONE, A. L. Non-infectious arthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Saunders, 2003. p. 606-610.
- CAMPEBELL, R. C.; PEIRÓ, J. R.; VALADÃO, C. A. A.; SANTANA, A. E.; CUNHA, F. Q. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**, v. 56, n. 3, p. 281-291, 2004.
- FISHER D. J. Sistema musculoesquelético. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003, p. 265-274.
- MAHAFFEY, E. A. Synovial fluid. In: COWELL, R. L.; TYLER, D. R. **Cytology and hematology of the horse**. California: American Veterinary Publications, 1992. p.153-161.
- MAY, S. A. Animal models and other experimental systems in the investigation of equine arthritis. In: McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 421-440.
- McILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: _____. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 120-144.
- SAS. **Statistical Analysis System User's Guide**. 4. ed. Cary, 1996. 842 p.
- SHELLY, S. M. Fluidos de cavidades corporais. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003. p. 157-172.
- TODHUNTER, R. J.; LUST, G. Synovial joint anatomy, biology, and pathobiology. In: AUER J. **Equine surgery**. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 844-866.
- VAN PELT, R. W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, p. 91-95, 1974.
- WHITE, G. W.; STITES, T.; JONES, E. W. Efficacy of intramuscular chondroitin sulfate and compounded acetyl-d-glucosamine in a positive controlled study of equine carpalis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, p. 295-300, 2003.
- WHITE, G. W.; SANDERS, T.; STITES, T. Efficacy of systemically administered antiarthritic drugs in an induced equine carpalis model. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 1996. Denver, Colorado, **Proceedings...** v. 42, p. 135-138, Denver, Colorado, 1996.
- WHITE, G. W. The efficacy of orally administered sulfated glycosaminoglycan in chemically induced equine synovitis and degenerative joint disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 14, p. 350-353, 1994.

Protocolado em: 6 ago. 2008. Aceito em: 5 mar. 2009.