

LÍQUIDO SINOVIAL DE EQÜINOS: PROTEÍNA, CELULARIDADE E PRECIPITAÇÃO DE MUCINA, A FRESCO, APÓS REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO

SYNOVIAL EQUINE FLUID: PROTEIN, CELLULARITY AND MUCIN CLOT, ON FRESH, AFTER COOLING AND FREEZING

Fabiola de Oliveira Paes Leme¹ Geraldo Eleno Silveira Alves² Antônio de Pinho Marques Júnior³
Ivan Barbosa Machado Sampaio⁴ Jorge José Rio Tinto de Matos⁵

RESUMO

Considerando que as patologias que determinam claudicação são comuns e representam um importante aspecto na Medicina Veterinária Equina, com cerca de 33% das claudicações de-
vendo-se a enfermidades articulares, o presente trabalho teve por objetivo comparar o líquido sinovial de eqüinos a fresco, após refrigeração e após congelamento, para avaliar sua estabilidade e possível utilização como terapêutica. Foram utilizados 25 animais dos quais foram obtidos, por artrocentese, 5ml de líquido sinovial de ambas as articulações intertársicas proximais. As amostras de cada animal foram misturadas e a amostra final foi dividida em três alíquotas, sendo então analisadas a fresco (G1), após refrigeração (G2) e após congelamento (G3). A proteína foi significativamente diferente entre os grupos I e II, e II e III ($p < 0,05$); todavia, nos grupos I e III foi equivalente ($p > 0,05$). Os grupos I e II, e I e III foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) quanto à contagem de leucócitos, enquanto os grupos II e III foram equivalentes ($p > 0,05$). O linfócito foi a célula de predomínio. Alterações morfológicas foram observadas em 8% dos leucócitos em animais do Grupo II e em 64% em animais do G3. Os três grupos estudados foram equivalentes quanto à precipitação de mucina ($p > 0,05$). Com base nos resultados, pode-se concluir que o líquido sinovial sofre alterações quanto à proteína e celularidade após refrigeração e congelamento, porém ainda permanece dentro dos parâmetros aceitáveis de normalidade.

Palavras-chave: eqüino, líquido sinovial, proteína, celularidade, mucina.

SUMMARY

Lameness related to arthropathies are common and so very important to Equine Veterinary Medicine, considering that almost 33% of all lamenesses are due to arthropathies. The present experiment aimed the evaluation of synovial fluid stability after cooling and freezing and its possible therapeutical utilization. Samples of synovial fluid were taken from 25 equines, from both intertarsus proximal joints by arthrocentesis. Samples from each animal were mixed and then divided into 3 aliquotes, and analysed fresh (G1), after cooling (G2) and after freezing (G3). The protein evaluation showed significant difference between G1 and G2 and G2 and G3, but G1 and G3 were statistically similar. Leukocytes counting showed G1 and G2, and G1 and G3 to be statistically different, but no difference was seen between G2 and G3. Lymphocyte was the predominant cell in 96% of the cases. Morphological abnormalities in 8% of the leukocytes of animals in G2 and in 64% of those in G3 were found. Mucin clot showed no difference between all groups studied. Based on the results, it was possible to conclude that the synovial fluid has different protein and cellularity values after cooling and freezing, but is still in the normal range.

Key words: equine, synovial fluid, protein, cellularity, mucin clot.

INTRODUÇÃO

A claudicação representa um aspecto importante na Medicina Veterinária Equina e cerca de 33% das claudicações devem-se a enfermidades ar-

¹ Médico Veterinário, Pós-graduando, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Rua Alagoas, 896/1101, 30130-160 Belo Horizonte, MG. E-mail: fabivet@dedalus.lcc.ufmg.br. Autor para correspondência.

² Professor Adjunto, Doutor, Escola de Veterinária, UFMG.

³ Professor Titular, PhD., Escola de Veterinária, UFMG.

⁴ Professor Titular, Doutor, Escola de Veterinária, UFMG.

⁵ Professor Auxiliar III, Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

ticulares (MENDE, 1988). Diagnóstico precoce e tratamento apropriados influenciam significativamente o prognóstico dessas enfermidades (STONEHAM, 1997).

O líquido sinovial de uma articulação normal é um dialisado do plasma modificado pela produção de ácido hialurônico, glicoproteínas e outras macromoléculas. Entretanto, a glicose e alguns eletrólitos também podem estar presentes no líquido sinovial, em concentrações similares às do plasma. As proteínas do plasma atravessam a barreira hemato-sinovial em quantidades inversamente proporcionais ao seu peso molecular (CLYNE, 1987) e seus valores normais estão entre 0,92 a 3,11g/dl (MAHAFFEY, 1992).

O líquido sinovial possui basicamente as funções de nutrir a cartilagem articular e lubrificar as superfícies articulares, minimizando o atrito natural entre cartilagens opostas (CLYNE, 1987). A articulação diartrodial de eqüinos tem sido descrita como uma unidade auto-sustentável, com integridade estrutural e funcional dependente das propriedades físico-químicas da cartilagem, do líquido sinovial, do suporte subcondral adequado e da estabilidade conferida pela fásia, ligamentos e músculos, necessária para assegurar movimentos associados ao uso da cartilagem. Substâncias como as proteinases são produzidas pela cartilagem articular e líquido sinovial dentro dessa unidade funcional (SPIERS *et al.*, 1994).

YANCIK *et al.* (1987) utilizaram a análise do líquido sinovial, o exame radiográfico e a artroscopia para a avaliação de enfermidades articulares, mesmo considerando que os dois primeiros exames não possibilitem a determinação precoce da enfermidade articular, e o terceiro necessita de anestesia prévia do paciente. Também a artrocentese percutânea é uma importante técnica para diagnóstico e tratamento de enfermidades articulares em eqüinos, no entanto, a contaminação hemorrágica do líquido sinovial é freqüente (MISHEFF & STOVER, 1991).

O tratamento das enfermidades articulares pode representar um desafio ao médico veterinário, uma vez que várias condutas terapêuticas têm sido empregadas, porém com resultados discutíveis. A administração intra-articular de dimetilsulfóxido (DMSO) tem demonstrado bons resultados anti-inflamatórios, reduzindo os radicais livres e a produção de prostaglandinas na articulação lesada, sem causar efeitos adversos (WELCH *et al.*, 1989). Entretanto, lesões articulares sépticas requerem tratamento rápido com antibioticoterapia sistêmica (STONEHAM, 1997).

A administração de anti-inflamatórios esteróides, intra-articular, é efetiva na supressão da inflamação, todavia pode causar redução na produção de

proteoglicanos e na síntese de colágeno, além de causar alterações morfológicas (GIBSON *et al.*, 1996). A persistência da inflamação na membrana sinovial determina importantes alterações no líquido sinovial, interrompendo a nutrição articular para agir como barreira para a reabsorção de fluidos, o que caracteriza um ciclo vicioso (MENDE, 1988).

O alotransplante de líquido sinovial foi estudado por MENDE (1988) em animais com artropatias inflamatórias e não-inflamatórias. Nesse estudo, a substituição de parte do líquido sinovial alterado por líquido sinovial normal teve efeito benéfico em todos os casos, uma vez que o próprio líquido sinovial interrompe o ciclo vicioso que pode ocorrer na osteoartrite, normalizando a membrana sinovial. O transplante de líquido sinovial, por se tratar de um tratamento menos deletério e econômico, pode ser indicado como método terapêutico alternativo, adjuvante no tratamento de enfermidades articulares (MENDE, 1988).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar amostras de líquido sinovial de eqüinos antes e depois da conservação sob refrigeração e congelamento, para conhecer sua estabilidade e sua viabilidade para transplante posterior.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 25 fêmeas eqüinas, sem raça definida, entre 2 e 18 anos de idade, sem alterações clínicas aparentes, criadas a campo e provenientes dos municípios de Sete Lagoas (13), Belo Horizonte (2) e Pedro Leopoldo (10). Cada animal foi identificado numericamente de 1 a 25. O líquido sinovial foi obtido por artrocentese de ambas as articulações intertársicas proximais, na sua face medial, segundo técnica descrita por STASHAK (1987), utilizando-se agulha hipodérmica 25x8 e seringa de 5ml descartáveis. As amostras foram homogeneizadas, formando uma única amostra por animal. Em seguida cada amostra foi dividida em três alíquotas. Cada alíquota foi separada em duas partes, com uma delas contendo anticoagulante EDTA sódico a 10%, na proporção de 1:50 de líquido sinovial.

As alíquotas foram transportadas em recipiente isolante térmico. Uma das alíquotas de cada animal foi analisada entre uma a três horas após a colheita (Grupo I = GI), outra foi refrigerada por 12 a 15 horas, a uma temperatura entre 4 e 8 °C, sendo analisada após esse período (Grupo II = GII), enquanto a terceira alíquota foi congelada (congelamento rápido em freezer) por 24 a 27 horas, sendo posteriormente mantida a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos, para descongelamento e subseqüente análise.

As amostras foram processadas e analisadas segundo técnicas descritas por MAHAFFEY (1992),

nas quais as proteínas foram determinadas por refratometria e a contagem celular realizada em hemacitômetro. A citologia foi analisada em esfregaços do líquido sinovial obtidos do sedimento após centrifugação e corados pelo método panótico de rotina (Figura 1). Os coágulos de mucina foram classificados em: “muito deficiente”, “deficiente”, “regular” e “bom”, em ordem crescente de qualidade (Figura 2).

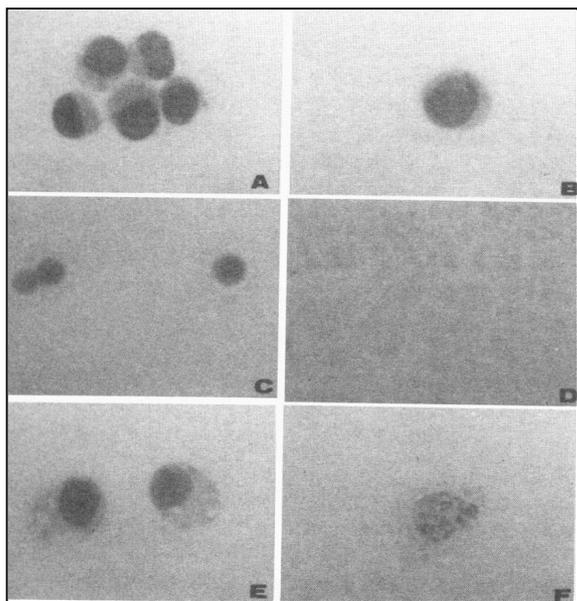


Figura 1 – Esfregaço do sedimento de líquido sinovial de equinos corado por panótico (x312).

- A – Aglomerado de linfócitos.
- B – Linfócito isolado.
- C – Eritrócitos circundados por mucina.
- D – Mucina.
- E – Vacúolos citoplasmáticos e perda de integridade de membrana citoplasmática, observados nos dois linfócitos, após a refrigeração do líquido sinovial por 12 a 15 horas.
- F – Pleomorfismo nuclear e citoplasmático, e degeneração celular observados em células do líquido sinovial de equinos, após congelamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Os dados da proteína e celularidade foram analisados pelo teste t de Student para dados pareados, enquanto os resultados da precipitação de mucina foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis (ARMITAGE, 1971).

A análise da proteína revelou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos GI e GII, e GII e GIII; entretanto, os grupos GI e GIII se mostraram

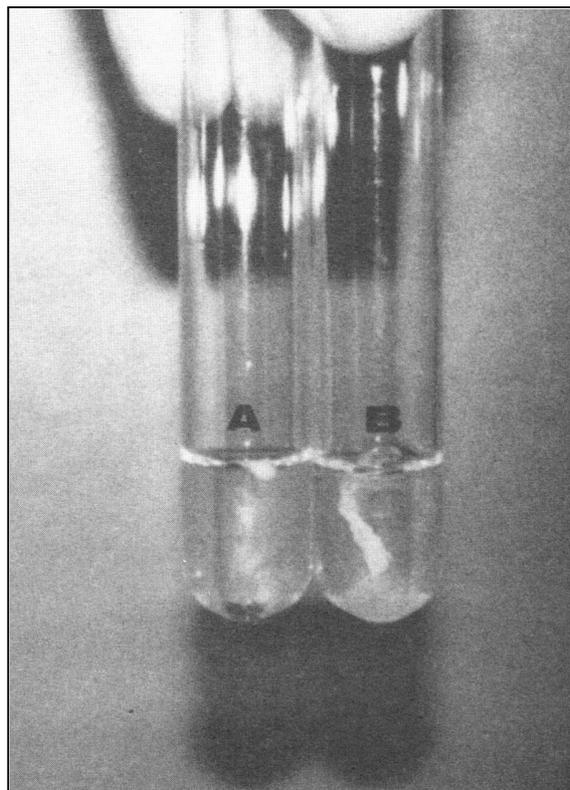


Figura 2 – Coágulos de mucina: (A) “deficiente”, (B) “bom”.

estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$). Observou-se um acréscimo no valor das proteínas do GII, o que pode estar relacionado com o tempo prolongado de contato entre a amostra e o anticoagulante utilizado. O mesmo não foi observado em GIII, provavelmente devido à estabilidade protéica proporcionada pelo congelamento. Os resultados obtidos nos três grupos analisados encontram-se dentro dos valores de normalidade (0,92 a 3,11g/dl), citados por MAHAFFEY (1992).

Os grupos GI e GII, e GI e GIII apresentaram contagens totais de leucócitos significativamente diferentes ($p < 0,05$), o que se justifica, uma vez que as células, de um modo geral, após conservação, tenderam à fragilidade e à ruptura citoplasmática com o passar do tempo. A análise entre os grupos GII e GIII demonstrou equivalência estatística ($p > 0,05$).

Os resultados da contagem total de leucócitos encontraram-se dentro dos parâmetros de normalidade (menos de 500 células / μ l) citados por DUNCAN & PRASSE (1986), para o líquido sinovial de equinos. É sabido que células nucleadas são responsáveis pela produção de substâncias importantes ao equilíbrio fisiológico do líquido sinovial e,

Tabela 1 - Valores da contagem total de hemácias e leucócitos, dosagem de proteína e teste de precipitação de mucina em líquido sinovial de equínos analisados a fresco (GI), após refrigeração (GII) e congelamento(GIII).

Animais	Hemácias (/mm ³)			Leucócitos (/mm ³)			Proteína (g/dl)			Mucina (score 1 a 4)*		
	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII
1	2080	2720	13	15	-	-	2,8	2,8	2,6	4	4	4
2	2720	1600	8	5	-	-	2,8	3,0	2,6	4	4	4
3	2720	2240	53	20	-	-	3,0	3,0	3,0	3	4	3
4	2880	70	10	5	-	-	2,2	2,4	2,0	4	3	3
5	250	65	15	10	3	-	2,4	2,6	2,4	4	4	4
6	240	200	10	10	-	-	2,0	2,2	2,0	4	4	4
7	5440	2880	8	22	3	-	2,0	2,0	2,0	4	4	4
8	1440	200	13	10	3	-	2,2	2,4	2,4	4	4	4
9	2240	740	5	8	-	-	2,4	2,4	2,4	4	4	4
10	610	510	88	10	-	-	2,0	2,2	2,0	4	4	4
11	1120	960	38	25	-	-	1,8	1,8	1,8	4	4	4
12	5440	2240	18	20	-	-	2,6	2,8	2,6	4	4	4
13	3520	110	15	5	-	-	3,0	3,0	2,8	3	2	1
14	905	525	35	85	25	30	2,2	2,0	2,2	4	4	4
15	415	335	30	30	20	10	2,2	2,2	2,0	4	4	4
16	2000	1250	5	50	15	10	2,0	2,0	1,8	3	2	2
17	265	155	15	40	10	10	2,4	2,2	2,4	4	4	4
18	3185	2380	375	350	225	10	2,4	2,4	2,4	4	4	3
19	2175	1830	20	25	40	20	3,0	3,2	3,0	4	4	4
20	60	50	10	25	30	5	2,2	2,6	2,4	4	4	4
21	15840	15360	-	40	43	-	2,2	2,6	2,4	4	4	4
22	2430	2500	10	25	25	20	2,4	2,4	2,6	4	4	4
23	2405	1225	5	5	30	40	1,8	2,0	2,0	4	4	4
24	880	720	5	50	20	20	2,0	2,2	2,0	4	4	4
25	75	65	-	30	20	10	2,2	2,2	2,0	4	4	4

* Em ordem crescente de qualidade, onde: 4- Coágulo "bom"; 3- Coágulo "regular"; 2- Coágulo "deficiente"; 1- Coágulo "muito deficiente".

Tabela 2 - Valores da % média obtidos na análise citológica do líquido sinovial de equínos analisado a fresco (GI), após refrigeração (GII) e congelamento (GIII).

Célula	GI	GII	GIII
Linfócito	78,36	83,68	70,12
Monócito	16,16	11,92	20,68
Neutrófilo	4,8	4,0	1,2
Eosinófilo	0,2	0,4	-

conseqüentemente, da articulação (SPIERS *et al.*, 1994).

A contagem total de eritrócitos revelou diferença significativa entre os três grupos ($p < 0,05$), o que comprovou a fragilidade dos eritrócitos quando sob refrigeração e congelamento. DUNCAN & PRASSE (1986) citaram que a presença de eritrócitos deve ser rara no líquido sinovial normal, o que não foi observado no Grupo GI (Tabela 1), no qual o menor

valor observado foi de 60 eritrócitos/mm³ e o maior de 15850/mm³. Tais achados podem estar relacionados à contaminação por sangue proveniente da técnica percutânea utilizada (MISHEFF & STOVER, 1991). Nesses casos de contaminação, há um aumento de leucócitos proporcional ao aumento de eritrócitos, o que não foi observado neste experimento. A razão eritrócito: leucócito foi muito variável. Considera-se que a redução do número de eritrócitos não altera, de modo drástico, a fisiologia do líquido sinovial desde que se encontre dentro dos valores de normalidade.

Quanto ao teste de precipitação de mucina, todos os grupos se mostraram equivalentes ($p > 0,05$). A mucina mostrou estabilidade satisfatória durante o experimento, o que foi notado em líquidos sinoviais que apresentaram coágulos de mucina "bons" no GI. Já os coágulos de mucina "regulares" (GI) não se mantiveram estáveis após refrigeração e congelamento (GII e GIII), ou seja, o coágulo de mucina só se mantém estável após refrigeração e congelamento, se for classificado como coágulo "bom", a fresco.

Houve predomínio de linfócitos na análise citológica (Tabela 2), o que diferencia dos achados de MAHAFFEY (1992), que cita os monócitos

tos/macrófagos como sendo as células de predomínio no líquido sinovial. Eosinófilos foram encontrados em aproximadamente 2,7% das análises. Em 96% das análises realizadas nesse experimento, os neutrófilos não excederam 10%, o que corrobora os achados de MAHAFFEY (1992). Também foram encontradas alterações morfológicas em 8% das análises do GII e em 64% das GIII.

CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento, pode-se concluir que o líquido sinovial sofre alterações quanto à proteína e celularidade após refrigeração e congelamento, porém ainda se mantendo dentro dos parâmetros de normalidade citados pela literatura. O coágulo de mucina a fresco, considerado “bom”, não apresenta alteração após refrigeração e congelamento. O congelamento proporciona menos alterações que a refrigeração, sendo, portanto, melhor.

AGRADECIMENTOS

A Fernando Bonna pelo apoio e companheirismo. A Rogéria Serakides e Renato Lima Santos pela gentileza de ajudar com as fotografias. A Danilo pela colaboração com a estatística. A Iuri e Prof. Marc Henry pelos animais cedidos ao experimento. A todos aqueles que direta, ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMITAGE, P. **Statistical methods in medical research**, London: Blackwell Scientific Publications, 1971, 504 p.
- CLYNE, M. J. Pathogenesis of degenerative joint disease. **Equine Vet J**, v. 19, n. 1, p. 15-18, 1987.
- DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**, 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p. 212-14, 1986.
- GIBSON, K.T., HODGE, H., WHITTEM, T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. **Austral Equine Vet**, v. 73, n. 4, p. 148-151, 1996.
- MAHAFFEY, E.A. Synovial fluid. In: COWELL, R.L., TYLER, R.D. (Ed.). **Cytology and hematology of the horse**. Philadelphia: Mosby, 1992. p. 153-161.
- MENDE, G.A.G. Allotransplantation of synovial fluid in equine species as a therapeutic alternative in some arthropathies and synovial effusions. **Equine Prac**, v. 10, n.7, p. 27-30, 1988.
- MISHEFF, M. M., STOVER, S. M. A comparison of two techniques for arthrocentesis of the equine metacarpophalangeal joint. **Equine Vet J**, v. 23, n. 4, p.273-76, 1991.
- SPIERS, S., MAY, S.A., BENNETT, D., *et al.* Cellular sources of proteolytic enzymes in equine joints. **Equine Vet J**, v. 26, n. 1, p. 43 – 50, 1994.
- STASHAK, T. S. **Adams lamenesses in horses**, 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, 906 p.
- STONEHAM, S.J. Septic arthritis in foal: practical considerations on diagnosis and treatment. **Equine Vet Educ**, v. 9, n. 1, p. 25-29, 1997.
- WELCH, R.D., DeBOWES, R.M., LIEPOLD, H.W. Evaluation of the effects of intra-articular injection of dimethylsulfoxide on normal equine articular tissues. **Am J Vet Res**, v. 50, n. 7, p. 1180-82, 1989.
- YANCIK, S.A., McILWRAITH, C.W., WAGNER, A.E., *et al.* Evaluation of creatine kinase and lactate dehydrogenase activities in clinically normal and abnormal equine joints. **Am J Vet Res**, v. 48, n.3, p. 463-66, 1987.