

HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CARLOS
SERVICIO DE TRAUMATOLOGÍA Y CIRUGÍA ORTOPÉDICA (JEFE DEL SERVICIO PROF. LÓPEZ-DURÁN)
SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS (JEFE DEL SERVICIO DR. VALOR PEREA)

Evaluación Biológica del Líquido Sinovial

**J.A. DE PEDRO, F.G. CASTRESANA, M.A. CUADRADO, E. MOSCARDÓ, M. NORIEGA,
F. MARCO, F.G. NAVARRETE y L.L. DURÁN.**

RESUMEN

La Fibronectina (FN) va a promover la adherencia de los macrófagos y es quimiotáctica para los fibroblastos. Estas propiedades sugieren un papel de esta proteína en la modulación de la inflamación y reparación del tejido articular lesionado.

Se han evaluado 98 muestras de líquido sinovial (LS), 56 de artropatías post-traumáticas, 26 de artrosis y 16 de artrosis reumatoide.

Los autores han considerado como parámetro de laboratorio: Proteínas totales (PT), Inmunoglobulinas G, A y M, C3 y C4 y FN.

Han observado un aumento medio significativo entre los valores de FN en LS de artritis reumatoide ($583,5 \pm 142,8$) cuando se comparó con artropatía ($363,8 \pm 14,5$) $p < 0.001$ y con artrosis ($429,1 \pm 80,9$) $p < 0.01$. El grupo de artritis reumatoide mostró un aumento significativo de la FN sinovial, cuando se compara con sus niveles plasmáticos ($399,2 \pm 137,4$) $p < 0.001$.

El aumento en los niveles de FN se atribuye a la necesidad orgánica de disponer de una opsonina inespecífica que facilite y promueva la eliminación de restos inertes.

Descriptores: Líquido Sinovial. Fibronectina. Artritis Reumatoidea.

SUMMARY

The FN promotes macrophage adherence, and is chemotactic for fibroblasts. These properties suggest a role for FN in the modulation of joint inflammation.

Other way it seemed that this protein concerned in the organization and repair of damaged or inflamed articular tissues.

98 synovial fluids specimens were evaluated. 56 postraumatic arthropaties, 26 arthrosis and 16 reumathoid arthritis.

The authors have considered as parameters of laboratory: proteins, G. A and M Immunoglobulins, C3 and C4 and FN.

A statically significative medium increase appeared between de FN values arthritis reumathod's synovial fluids ($583,5 \pm 142,8$) when it is compared with postraumatic arthropaties ($363,8 \pm 14,5$) $p < 0.00$. and with osteoarthritis ($429,1 \pm 80,9$) $p < 0.01$.

Artritis reumathoid grup showed also a significantly increase between the values of FN in Synovial fluids when it is compared with plasmatic levels ($399,2 \pm 137,4$) $p < 0.001$.

The increases in the levels of the FN, have been attributing to a organic necessity of disposing of an unspecific opsonin which facilitate and provide the elimination of inert rests.

Key Words.: Synovial Fluid. Fibronectin. Rheumatoid Arthritis.

INTRODUCCIÓN

Clásicamente el LS se ha venido considerando como un ultrafiltrado del plasma con

características especiales. Paracelso fue el primero que describió la naturaleza mucino-viscosa de este fluido. Bichat, 1812, hipotetizó que el LS era un dializado de suero al que

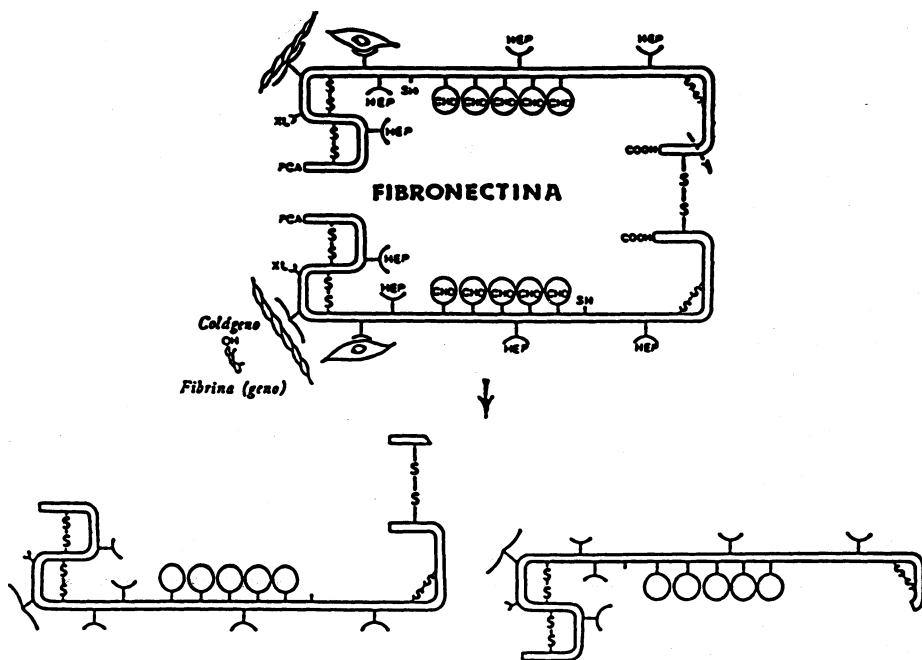


FIGURA nº 1. Estructura de la fibronectina. Se observan las zonas de unión a la heparina (Hep), colágeno, Fibrina, Proteína C (PCA).

se le añadía además ácido hialurónico, responsable de su alta viscosidad (1), finalmente el estudio clásico de Ropes, 1939 (2), afianzó esta teoría. Actualmente se piensa que es más importante el concepto de líquido sinovial como expresión funcional articular, siendo su análisis biológico esencial en la evaluación del índice de sufrimiento articular (3).

En las articulaciones, especialmente en la de la rodilla, es necesario en muchos casos el realizar una evacuación del hidratos para una mejor función y exploración. Esta punción nunca deberá ser únicamente evacuadora sino también diagnóstica, ya que el análisis microscópico y bioquímico van a aportarnos datos de gran fiabilidad a la hora de una orientación tanto diagnóstica como terapéutica (4).

Con respecto a la FN se trata de una familia de Beta-glicoproteínas que son estructural e inmunológicamente similares (5) (Fig. 1), y cuyo significado funcional se desconoce en parte. Parece que interviene en múltiples funciones celulares que incluyen la adhesión celular e integridad de los tejidos (6), morfo-

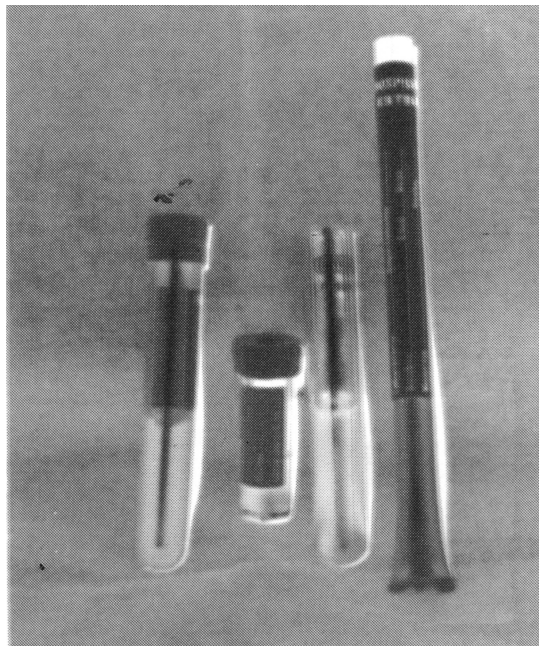
Tabla I:
SELECCIÓN DE GRUPOS

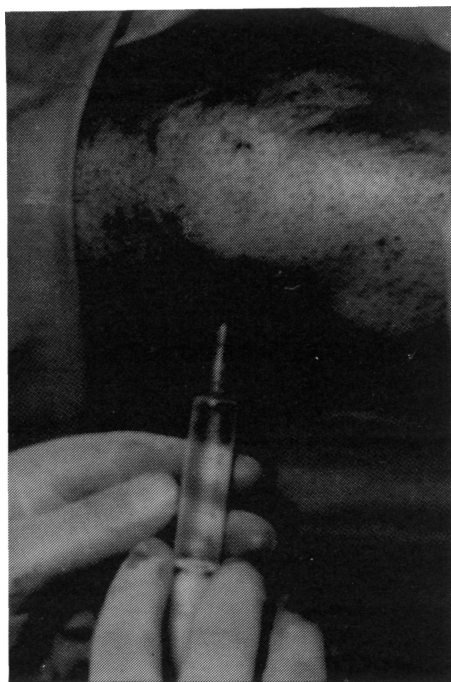
Grupo A-	Artropatías Mecánicas: 41 casos
A 1	Artropatías Postraumáticas: 28 casos
A 2	Artrosis: 13 casos
Grupo B-	Artritis Reumatoide: 8 casos

logía, diferenciación celular y organización citoesquelética; actividad opsónica (7), hemostasia y trombosis (8) y fagocitosis (9).

Es de destacar el papel de esta proteína en la inflamación, ya que promueve la adherencia de los macrófagos al foco de lesión (10), es quimiotáctica para los fibroblastos (11 y 12) y actúa como opsonina para la fibrina y el colágeno desnaturalizado (13).

En definitiva, la FN va a ser esencial en la regulación de la inflamación articular, presentando un importante papel funcional y estructural en la organización y reparación de las





estructuras intraarticulares inflamadas. Corroborando esta teoría, la especial interacción que esta proteína tiene con ciertos componentes como: fibrina, colágeno y glicosaminoglicanos (11).

Es por todo esto que nos ha parecido interesante el investigar los niveles de la FN en las diferentes artropatías.

Por otra parte, aunque la síntesis sinovial de inmunoglobulinas y complemento se ha demostrado en la artritis reumatoide (12), es de destacar que no están descritos niveles en el líquido sinovial más altos que los hallados en el plasma para ninguna de las proteínas secretoras, excepto para la FN (13 y 14).

Nos surge así la duda de si el aumento de los niveles de esta proteína están en relación con el aumento de permeabilidad de la membrana sinovial o si bien intervendría predominantemente una elevación de su síntesis a nivel de la articulación. En este sentido, el estudio de los niveles de FN en el LS, podría servir como un mejor índice de la actividad en la enferme-

dad articular; en concreto, más que los tests indirectos como la VSG o las proteínas de fase aguda los cuales van a responder a estímulos más generales.

En resumen, los objetivos perseguidos al realizar este trabajo han sido:

- Estudio de la FN con el fin de investigar si es un mejor índice de sufrimiento articular.
- Correlación de los niveles de FN con parámetros ya conocidos de inflamación orgánica.
- Evaluación de los valores de FN y su relación con la reparación tisular.

Material y Métodos

Se han evaluado un total de 98 muestras sinoviales procedentes de 49 casos de patología articular. Los detalles se expresan en la Tabla I.

La extracción del LS se realiza mediante artrocentesis, utilizando un Abbocath Pts 14 sin aguja metálica conectado a una jeringa (Fig. 2). No se introduce anestésico intrarticular y se desechan los primeros c.c. de líquido extraído.

Las muestras se recogen en 3 tubos. El primero con anticoagulante, el segundo con heparina de litio y el tercero con EDTA (Fig. 3).

El estudio de morfología y recuento celular se realiza inmediatamente después de la extracción del líquido con EDTA.

Entre las 2 y 4 horas siguientes a la punción se centrifugan a temperatura ambiente durante 15 minutos a 2.500 rev. pm. con el fin de separar los elementos celulares.

Del sedimento del tubo sin anticoagulante se realiza el estudio de cristales.

Las determinaciones bioquímicas se efectúan a partir del tubo con heparina de litio, salvo la FN que se determina en el líquido que contiene EDTA, ya que este tipo de anticoagulante al ser un quelante del Ca y del Mg bloquea la coagulación e inhibe la activación de las plaquetas, no uniéndose estas a la FN. Además se ha observado como las muestras recogidas con heparina, presentan una tasas significativamente más bajas de FN que las que se han recogido con EDTA (15).

Las muestras son congeladas a -40 GC hasta su posterior procesamiento, momento en que se las trata con una solución despolimerizante de hialuronidasa al 5%, manteniéndolas en el baño a 37 GC durante, aproximadamente, 15 min. Esto nos servirá también para que no quede la FN crioprecipitada, ya que esta proteína coprecipita con fibrina o fibrinógeno, Tabla II.

Las proteínas totales (PT) fueron evaluadas por colorimetría, mediante la reacción de Biuret.

Las Ig G, A y M, fracciones del complemento C3 y C4 y FN fueron determinadas por inmunonefelometría a tiempo fijo (Behring).

El factor reumatoide fue evaluado mediante inmunonefelometría cinética.

La glucosa, LDH, ácido úrico, fosfatasa ácida fueron realizados por métodos convencionales.

Estudio Estadístico

Al observar que la distribución de la población no era normal aun tras realizar una transformación logarítmica,

Tabla II:

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LÍQUIDO SINOVIAL

- Centrifugación durante 15 minutos a 2.500 Rev/Min.
- Congelación A - 20°C

PARA SU ANÁLISIS:-

- Incubación a 37°C Durante 30 Min
- Hialuronidasa al 5% (1.500 UI/L)

aplicamos para la comparación de medias el test no paramétrico de Mann Whitney. También realizamos estudios de correlación simple mediante el coeficiente de correlación de Pearson y de regresión multivariante.

Resultados²

Con respecto a la INMUNOGLOBULINAS.

En la Fig. 4 se observa como la Ig G presentó un ascenso significativo en el grupo de artritis reumatoide (B) ($1.237,2 \pm 444,7$) con respecto al grupo de artropatías mecánicas $p < 0.001$.

Los valores más bajos se hallaron en los pacientes afectados de artrosis ($120,5 \pm 18,2$).

La IgA evidenció un comportamiento diferente, estando elevada significativamente $p < 0.01$ en el grupo de artropatías postraumáticas ($168,9 \pm 74,3$) con respecto a los otros 2 grupos.

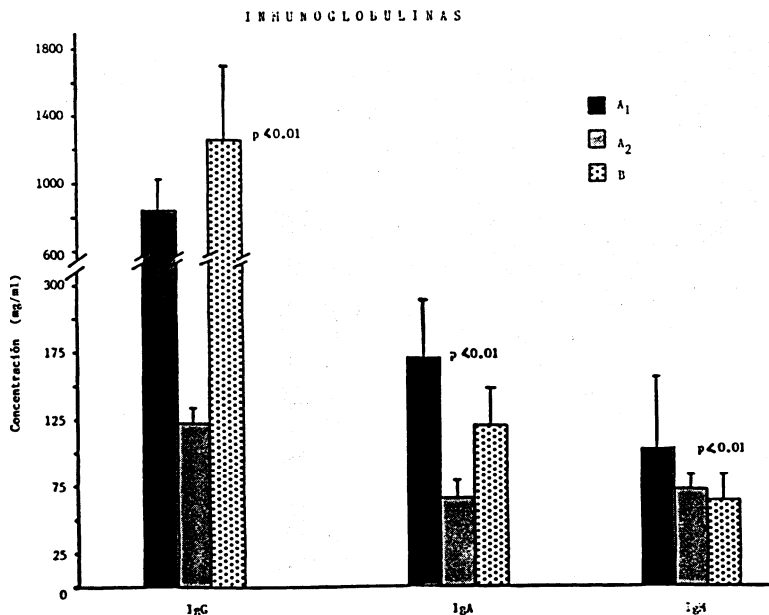


FIGURA nº 4. Concentraciones en líquido sinovial de Inmunoglobulinas.

Grupo A 1: Artropatías postraumáticas

A 2: Artrosis

B: Artritis reumatoide.

IgG: Inmunoglobulina G, IgA: Inmunoglobulina A

IgM: Inmunoglobulina M

También la IgM tuvo unos niveles significativamente más altos en las artropatías posttraumáticas ($101,9 \pm 59,8$) $p < 0.01$ en relación al grupo B ($61,1 \pm 24,6$).

LAS FRACCIONES DEL COMPLEMENTO C3 y C4 presentaron un patrón similar, (Fig. 5). Encontrándose disminuidos de forma significativa, el C3 $p < 0.001$ y el C4 $p < 0.01$ en el grupo de artritis reumatoide con valores de ($38,6 \pm 11,1$) y ($8,59 = 1,6$ respectivamente).

Se halló una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de ambas fracciones del complemento en todos los grupos.

Las Proteína Totales (Fig. 6), aparecen elevadas significativamente en las artropatías posttraumáticas $p < 0.001$.

Encontramos, también, una correlación entre el número de leucocitos y los niveles de FN

sinovial, en el grupo de artritis reumatoide y artrosis y una correlación entre el número de leucocitos y la FN en la artritis reumatoide ($r=0,594$ $p < 0.05$) (Fig. 7).

La Fibronectina Sinovial (FNS) (Fig. 8), mostró ascensos significativos en el grupo de artritis reumatoide ($583,5 \pm 142,8$) con respecto al de artropatías posttraumáticas ($363,8 \pm 14,5$) $p < 0.001$ y al de artrosis ($429,1 \pm 80,9$) $p < 0.01$.

La Fibronectina Plasmática (FNP) (Fig. 8), se comportó de forma diferente, no presentándose diferencias significativas en los grupos estudiados.

Al comparar los niveles de FN sinovial y plasmática se observó en el grupo de artritis reumatoide como los niveles sinoviales ($583,5 \pm 142,8$) eran significativamente más altos que los plasmáticos ($399,2 \pm 137,6$) $p <$

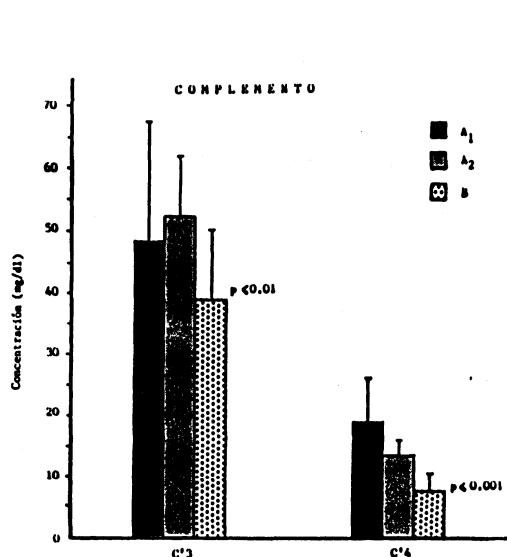


FIGURA nº 5: Concentraciones en líquido sinovial de C3 y de C4.

- A 1: Artropatías posttraumáticas
- A 2: Artrosis
- B: Artritis Reumatoide

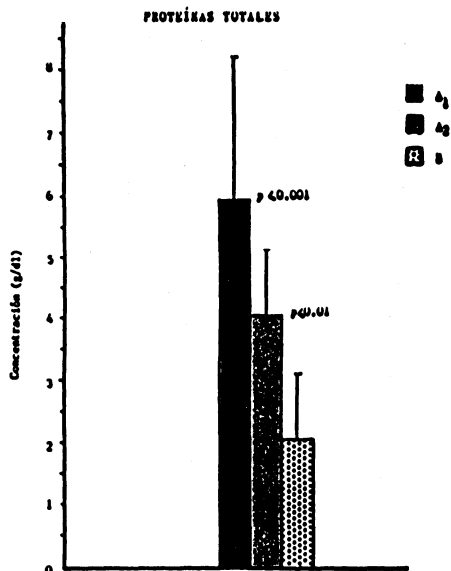


FIGURA nº 6: Representación de los niveles de proteínas totales en el líquido sinovial de los diferentes grupos.

0.01. Un ligero ascenso se evidenció también en el grupo de artrosis, pero éste no fue estadísticamente significativo.

Finalmente al intentar hallar una correlación entre las concentraciones de FN en los dos fluidos, sinovial y plasmático, solamen-

te se mostró una correlación positiva estadísticamente significativa ($r= 0.903$ $p< 0.01$) en el grupo de artropatías postraumáticas no apareciendo ningún tipo de correlación en el de artritis reumatoide.

Discusión

Aunque el LS es básicamente un ultrafiltrado del plasma combinado con ácido hialurónico (3), su composición va a depender de la permeabilidad de los vasos sanguíneos adyacentes y de la síntesis local de sustancias por las células de la membrana sinovial (14).

Con respecto a las proteínas, aunque se ha demostrado que a nivel de membrana sinovial existe una síntesis de inmunoglobulinas y complemento (12), no hemos encontrado que sus niveles sean más altos que los que se hallan en ese mismo caso en el plasma. Sin embargo, algunos autores (14, 16, 17 y 18), y nosotros,

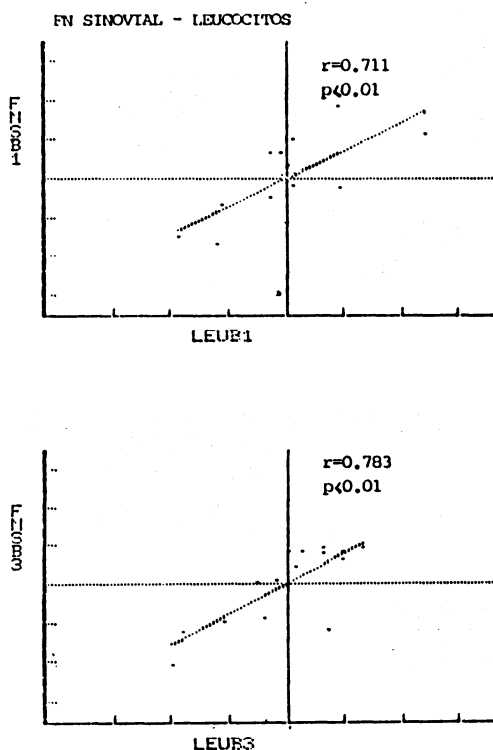


FIGURA nº 7: Representación gráfica de la correlación simple significativa que se presenta entre los niveles de leucocitos y de fibronectina sinovial.

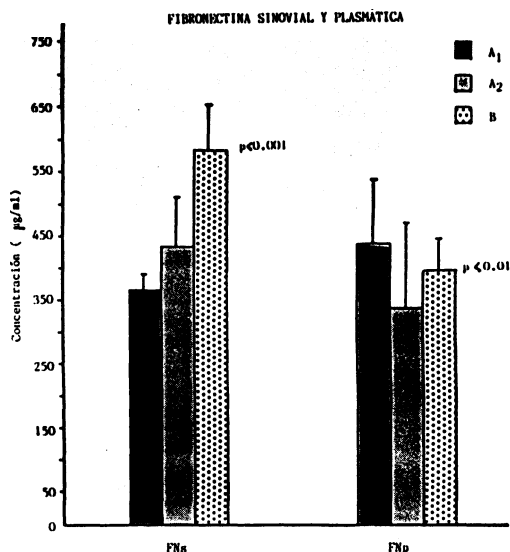


FIGURA nº 8: Niveles de Fibronectina en el líquido sinovial (FNs) y en el plasma (FNp) en los diferentes grupos estudiados.

hemos encontrado como predominante en procesos de artritis reumatoide, y también en otras artropatías como la artrosis los niveles de FN a nivel del fluido sinovial se presentan más altos que los encontrados en el plasma de estos mismos pacientes.

Esto nos inclina a pensar en la existencia de síntesis de FN a nivel de la membrana sinovial. De hecho Scott (1981) (19), al realizar estudios de inmunofluorescencia en la membrana sinovial de pacientes afectados de artritis reumatoide, observó como se presentaba una tinción intensa en los nódulos hipertróficos de la capa superficial de los villi y de algunas células sinoviales. También evidenció como en los casos de osteoartrosis de larga duración aparece una fluorescencia positiva para la FN en las zonas de reactividad.

La elevación de FN sinovial podría ser la consecuencia de una reestructuración de la membrana sinovial sea de tipo hiperplástico, con aumento de la producción, sea de tipo destructivo, con liberación de FN tisular (15).

Carnemola y cols. (1984) (18) han demostrado una diferencia estructural entre la FN plasmática y la sinovial, lo que nos aporta un argumento suplementario en favor de una síntesis local de FN. Esta diferencia estructural, sin embargo, no repercute de ninguna forma en la técnica utilizada para evaluar esta proteína (13).

Por otra parte, Vartio (1981) (14) expone como la FN encontrada en el LS artrítico es indistinguible tanto inmunológicamente como en su composición en la cadena de polipéptidos de la forma plasmática de FN.

En resumen, la FN que se encuentra presente en el LS de las diferentes artropatías puede ser de dos orígenes. En parte refleja la destrucción del tejido sinovial con disrupción de la barrera endotelial, llevando a un aumento en la difusión de las proteínas plasmáticas, mecanismo que parece ser el predominante en el grupo de artropatías postraumáticas, y en parte podría ser producida localmente a nivel

del tejido sinovial hecho preferente en el caso de la artritis reumatoide.

La falta de correlación entre los niveles de FN sinovial y plasmática en el grupo de artritis reumatoide corrobora el hecho anterior.

La concentración de los componentes del complemento del LS depende de la filtración de las proteínas, pero también está influenciado indirectamente por la síntesis local de algunos componentes y por su catabolismo en el espacio articular (20,21).

Nosotros hemos observado como en el grupo de artritis reumatoide se encuentran disminuidos los niveles de C3 y C4, siendo debido esencialmente a la activación y consecuente deplección del sistema del complemento. Por otro lado, Perrin (1977) (20) observa como el paralelo incremento de C3d y C4d en estos pacientes sugiere una activación de la vía clásica del complemento.

El aumento de IgG que se presenta en la artritis reumatoide es debido a síntesis local por el endotelio sinovial siendo en el resto de los grupos su origen primordial, el aumento de permeabilidad existe una membrana sinovial lesionada (22).

Finalmente la correlación existente entre la FN sinovial y el número de leucocitos en todas las artropatías corrobora su papel como proteína opsonica a nivel del foco de lesión, es decir, la cavidad articular (23).

BIBLIOGRAFÍA

1. SCOTT, D.L., WALTON, K.W.: Fibronectin in rheumatoid and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1980, 39:598.
2. NORTH, M.L., LECOCQ, J., ROTH-FRITSCH, M., PIFFAUT, M.C., ASCH, L.: Dosage de la fibronectine aynoviales par néphéломétrie laser. Son intérêt diagnostique en Rhumatologie. *Ann Biol* 1985, 43: 861-866.
3. CLEMMENSEN, I., ANDERSEN, R.B.: Different molecular forms of fibronectin in rheumatoid synovial fluid (abstract no. 39). *The IXth European Congress of Rheumatology. Wiesbaden 1979.*
4. CLEMMENSEN, I.: Fibronectin and its role in connective tissue diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 1981, 11: 145-146.
5. LAURELL, C.B.: Electroimmuno Assay. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 1972, 29: 21-36.
6. CLEMMENSEN, I., ANDERSEN, R.B.: Differente molecular forms of fibronectin in rheumatoid synovial fluid. *Arthr & Rheum* 1982, 25: 25-31.
7. VARTIO, T., VAHERI, A., ESSEN, R., ISOMAKI, H., STENMAN, S.: Fibronectin in Synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1981, 11: 207-212.
8. CLEMMENSEN, I., ANSERSEN, B.: Fibronectin in rheumatoid plasma and synovial fluid. *Scand J. Rheumatol* 1980, 33: 127-134.
9. CLEMMENSEN, I., ANDERSEN, R.B.: Properties of fibrinogen-antigenic material on the rheumatoid synovial membrane and in the rheumatoid synovial fluid. *J. Lab. Clin. Med.* 1978, 92: 678-686.
10. Carsons,S., Mosesson, M.W., Diamond, H.S.: Detection and quantitation of fibronectin in synovial fluid from patients with rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1981, 24: 1261-1267.
11. CLEMMENSEN, I., HOLUND, B., ANDERSEN, R.B.: Fibrin and fibronectin in rhumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1983, 26: 479-483.
12. CARSONS, S., LAVIETES, B.B., DIAMOND, H.S, KINNEY, S.G.: The immunoreactivity, ligand, and cell binding characteristics of rheumatoid synovial fluid fibronectin. *Arth & Rheum* 1985. 28: 601-611.
13. LU-STEFFES, M., LAMMARTINO, A.J., SCHMID, F.R., CASTOR, C.W., DAVID, L., ENTWISTLE, R., ANDERSON, B.: Fibronectin in rheumatoid and non-rheumatoid arthritic synovial fluids and in synovial fluid cryoproteins. *Ann Clin. Lab. Sci.* 1982, 12: 178-185.
14. IAMMARTINO, A.J., ANDERSON, B., DONAKOWSKI, C., SCHMID, F.R.: Detection of fibronectin in rheumatoid and non-rheumatoid synovial fluids and cryoproteins. (Abstract). *Arthritis Rheum* 1980, 23: 694.
15. LECOCQ, J., NORTH, M.L., GRANCE, D., HAUPTMANN, G., KUNTZ, J.L., MEYER, R., ASCH, L.: Fibronectine plaasmatique et synoviale. Résultats d'une recherche personnelle. *Rev. Rhum. Mal. Ostéoartic* 1984, 51: 393-398.
16. SHIOZAWA, S., ZIFF, M.: Immunoelectron microscopic demonstration of fibronectin in rheumatoid pannus and at the cartilage-pannus junction. *Ann Rheum Dis.* 1983, 42: 254-259.
17. LINCK, G., STOCKER, S., GRIMAUD, J.A., PORTE, A.: Mise en évidence immunohistochimique d'une localisation élective de la fibronectine dans la couche intimale de la membrane synoviales et à la périphérie des cartilages articulaires chez la souris. *C.R.*

- Acad. Sci. Paris.* 1982, 295: 385-391.
18. SCOTT, D.L., WAINWRIGHT, A.C., WALTON, K.W., WILLIAMSON, N.: Significance of fibronectin in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1981, 40: 142-153.
19. CARSON, S., CHANDRESEKHAR, N., DREW, H., DIAMOND, H.: Fibronectin in human synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1980, 23: 661-666.
20. CARNEMOLLA, B., CUTOLO, M, CASTELLANI, P., BALZA, E., RAFFANTI, S., ZARDI, L.: Characterization of Synovial fluid fibronectin from patients with rheumatic inflammatory diseases and healthy subjects. *Arthr & Rheum* 1984, 27: 913-921.
21. SCOTT, D.L., FARR, M., CROCKSON, A.P., WALTON, K.W.: Synovial fluid and plasma fibronectin levels in rheumatoid arthritis. *Clin Sci* 1982, 62: 71-76.
22. MATSUBARA, T., SPYCHER, M.A., RUTTNER, J.R., FEHR, K.: The localization of Fibronectin in Rheumatoid arthritis synovium by light and electron microscopic immunohistochemistry. *Rheumatol Int* 1983, 3: 153-159.
23. CARSON, S., LAVIETES, B.B., DIAMOND, H.S., MOSESSON, M.W.: Synovial fluid fibronectin. *Eur. J. Clin. Invest.* 1982, 12: 8-13.

AGRADECIMIENTO: Los autores agradecen al Dr. GUILLÉN GARCÍA, de la clínica MAPFRE, iniciador de esta línea de investigación su apoyo científico.