

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

**RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE UREA SÉRICA Y SINOVIAL
DE TARSO Y CARPO EN CABALLOS FINA SANGRE DE CARRERAS
CLÍNICAMENTE SANOS.**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al **TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.**

CARLOS MAURICIO MADRID LAMATTA
VALDIVIA - CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Juan Galecio N.

PROFESOR COPATROCINANTE

Dr. Oscar Araya V.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Arturo Escobar

Dra. Sara Rodríguez C.

FECHA DE APROBACIÓN:

21 de abril de 2008

ÍNDICE

Capítulo		Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN	15
7. BIBLIOGRAFÍA	17
8. ANEXO	21
9. AGRADECIMIENTOS	22

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de urea sérica y sinovial de la articulación intercarpal y tibio-tarsal en equinos fina sangre de carrera, clínicamente sanos, a fin de compararlas y obtener el grado de correlación existente entre éstas.

Se utilizaron treinta equinos fina sangre de carrera clínicamente sanos en entrenamiento convencional, entre 2 y 7 años de edad, obteniéndose de cada uno una muestra de sangre y una de líquido sinovial tanto de la articulación intercapal como la articulación tibio-tarsal. Las concentraciones de urea de las diferentes muestras se determinaron a través del método GLDH enzimático para determinaciones cinéticas de urea.

Las concentraciones de urea sérica y sinovial de la articulación intercarpal y tibio-tarsal presentaron valores similares entre si ($P > 0,05$), obteniéndose una correlación alta y positiva entre las concentraciones de urea sérica y sinovial de la articulación tibio-tarsal ($r = 0,879$) e intercarpal ($r = 0,78$).

Se puede concluir de este estudio que las concentraciones de urea sérica y sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal en equinos fina sangre de carrera clínicamente sanos no poseen diferencias estadísticamente significativas, siendo las concentraciones de urea sinovial asociadas a las concentraciones séricas de urea.

Palabras clave: Urea, articulación, equinos, líquido sinovial.

2. SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN SERIC UREA CONCENTRATION AND SINVIAL FLUID UREA CONCENTRATION FROM TARSAL AND CARPAL JOINT IN CLINICALLY HEALTHY THOROUGBREED

The objective of this study was to determinate the serum urea concentration and synovial urea concentration of the intercarpal and tarsocrural joint in clinically healthy thoroughbred, to compare and correlate them.

Thirty clinically healthy thoroughbred in convencional training were use, between 2 and 7 years old, getting of each one a blood sample and sinovial fluid sample from the intercarpal joint and the tarsocrural joint. The urea concentrations from each sample were determinate by the enzymatic GLDH metod for cinetic determination of urea.

Serum and sinovial urea concentration from the intercarpal joint and tarsocrural joint were similar ($P>0,05$), getting a high and positive correlation between serum urea concentration and sinovial urea concentration from tarsocrural joint ($r=0,879$) and intercarpal joint ($r=0,78$).

From this study can be concluded that serum urea concentrations don't have a significant statistical difference with the synovial urea concentration in clinically healthy thoroughbred, being the synovial urea concentration associated with the serum urea concentration.

Key words: Urea, joint, equine, synovial fluid.

3. INTRODUCCIÓN

La claudicación en los equinos es el motivo más común de su retiro deportivo (Rossdale y col 1985, Todhunter y Lust 1990, Olivier y col 1997), siendo la causa más importante de ésta los problemas articulares (Todhunter 1996). Esto explica por que la osteoartritis es la enfermedad económicamente mas importante en los equinos de deporte y entretenimiento (Van den Boom y col 2005) y se presenta en diferentes articulaciones dependiendo de la función del equino, siendo en los equinos de carrera las articulaciones metacarpofalangica y carpal las más comúnmente afectadas (Pool 1996, Rossdale y col 1985).

Los cambios radiológicos que acompañan a la osteoartritis son aparentes en las etapas más tardías de la enfermedad y están correlacionadas con una leve signología clínica (Troter y McIlwraith 1996, Kidd y col 2001). La discrepancia entre los signos radiográficos y la severidad de la enfermedad, ha llevado a la búsqueda de marcadores biológicos para poder detectar tempranamente una enfermedad degenerativa articular, tiempo en el cual el reposo y la terapia puede prevenir un futuro daño a la articulación, especialmente al cartílago articular (Van den Boom y col 2005). Es así como el examen de líquido sinovial (LS) se recomienda sea de rutina, debido a que proporciona valiosa información sobre la condición en la cual se encuentra la articulación. Si bien los análisis convencionales no dan un diagnóstico específico, a no ser que la artritis sea de carácter séptico, nos indican la magnitud de daño articular y las alteraciones en su metabolismo (McIlwraith 2001). Durante el ejercicio, inflamación aguda y crónica, se producen cambios en la composición y volumen de LS (Van den Boom y col 2005), lo que genera una dificultad al evaluar los resultados obtenidos del examen de LS, debido que el aumento del volumen de éste, se produce una dilución de los marcadores de daño articular (Gough y col 2002).

Otra limitación que se presenta durante la obtención de LS mediante artrocentesis es el volumen obtenido, siendo difícil obtener una cantidad de muestra adecuada aunque sean articulaciones de gran tamaño o que presenten efusión. Para minimizar este problema se han descrito métodos alternativos para la obtención de muestras de líquido sinovial, siendo el lavado articular con una solución fisiológica el que comúnmente se usa tanto en medicina humana como veterinaria (De Bruin y col 2005). Esta técnica nos entrega una cantidad suficiente de muestra, sin embargo, al no conocer la dilución exacta en la cual se encuentra el LS, no podemos determinar con certeza la concentración del metabolito que deseamos medir (De Bruin y col 2005).

3.1 Cápsula articular

La cápsula de una articulación diartrodial está compuesta de dos capas, la capa externa fibrosa, que esta compuesta de colágeno y fibras elásticas, lo que ayuda a mantener la estabilidad de la articulación (McIlwraith 2001), y la capa interna o membrana sinovial,

compuesta de tejido conectivo laxo, altamente vascularizado (Vandenabeele y col 2001) que asegura la homeostasis a través de procesos secretorios y de absorción, participando además en procesos de fagocitosis y regeneración de la cápsula articular (Lasta 1998). La membrana sinovial posee una capa de células adyacentes al líquido sinovial (lamina synovialis intima), y una capa de soporte (lamina synovialis subintima) que se mezcla con la capa fibrosa de la cápsula articular (Vandenabeele y col 2001). La lamina synovialis subintima fue tipificada por primera vez en 1928 (Iwanawa y col 2000), y se las clasificó según su tipo en areolar, adiposo o fibroso, diferenciándose estos en la composición del tejido conectivo adyacente a la lamina synovialis intima (Iwanawa y col 2000). La lamina synovialis intima esta compuesta de 1 a 3 capas de sinoviocitos, sin una membrana basal (Mäkelä 2005). Estas capas celulares se componen de 2 tipos celulares distintos, que se denominan A y B (Lasta 1998).

Las células tipo A son derivadas de una línea de macrófagos que difiere en origen, diferenciación y potencial proliferación de las células tipo B, las cuáles se consideran derivadas de células tipo fibroblásticas (Vandenabeele y col 2001). Las células de tipo A son las más numerosas, poseen múltiples prolongaciones citoplasmáticas, un aparato de Golgi desarrollado y mitocondrias de gran tamaño, se le atribuyen funciones fibroblásticas y macrofágicas (Lasta 1998) y se ha documentado un aumento de este tipo celular en etapas tempranas de enfermedad articular (Kraan y col 1999).

Paralelamente las células del tipo B son alargadas u ovoides y con un retículo endoplásmico rugoso muy prominente, razón por la cual se consideran células secretoras. Se postula que las células tipo B tienen la función de sintetizar material rico en proteínas, el cual es secretado hacia el intersticio íntimo o en el espacio articular. Se ha demostrado que estas células sintetizan proteínas como procolágeno, fibronectina, proteínas de unión a ácido hialurónico, glicoproteínas lubricantes, ácido hialurónico y proteoglicanos (Vandenabeele y col 2001). Según Linck y Porte en 1978, citado McIlwraith 2001, sugirieron que las células B de roedor están involucradas en un mecanismo de regulación hormonal, considerando su proximidad a vasos fenestrados, sensibilidad a desordenes hormonales y degranulación en respuesta a noxas locales, además Kitamura y col (1999) determinaron que células B de equinos son marcadas con Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5), el cual es un marcador específico de proteínas citoplasmáticas de células neuronales y, por lo tanto, un marcador valioso de neuronas y fibras nerviosas, así como también de paraneuronas sensoriales.

A pesar de todos los estudios hechos hasta el momento, la actividad metabólica de los sinoviocitos no esta aun completamente dilucidada, siendo necesarios futuros trabajos para comprender su rol en la fisiología y patofisiología articular (Vandenabeele y col 2001).

3.2 Líquido Sinovial

El LS es incoloro y en ocasiones puede tener un tenue color amarillento, su consistencia es viscosa, es inodoro y presenta un aspecto limpio y transparente (Lein e Iglesias Elizondo 1985). Se postulan numerosas teorías sobre el origen del LS, se ha propuesto que éste es producido por glándulas de la membrana sinovial, por desintegración de la membrana sinovial y transudación, por destrucción del cartílago articular debido a intenso uso, por

secreción glandular y transudación de los capilares sanguíneos y linfáticos (Lasta y col 1995), sin embargo, se puede decir que no hay un conocimiento exacto de la forma de producción de LS, pero actualmente se acepta que éste se produce mediante el procedimiento de filtrado plasmático, proceso en el cual, la distribución de las partículas, entre el plasma y el líquido sinovial se realiza por el equilibrio Gibb-Donnan (Lasta 1998).

El filtrado plasmático que forma el LS tiene una baja concentración de proteínas y es libre de fibrinógeno, por lo tanto no coagula espontáneamente (Lasta 1998), y una vez dentro de la cavidad articular es modificado por las células de tipo B de la membrana sinovial, principalmente por la adición de ácido hialurónico y glucosamina (Feldman 1984, Coppo y col 1988). El hialuronato incrementa la viscosidad del LS lo cual proporciona una adecuada lubricación a la membrana sinovial y al cartílago articular. Además el hialuronato influye en la composición del líquido sinovial, McIlwraith (2001) sugiere que ayuda a detener el paso de solutos hacia el LS formando una barrera de resistencia en el agua que lo rodea provocando que los solutos de gran tamaño no ingresen hacia el LS, no afectando esto a las moléculas de menor tamaño. Lo anterior nos explica porque en enfermedad, los cambios producidos en el hialuronato, en conjunto con los provocados en la membrana sinovial, provocan un cambio en los componentes del LS (McIlwraith 2001).

Al LS se le atribuyen las siguientes funciones: producir la depuración de los desechos celulares, realizar una amortiguación entre las distintas caras articulares, mantener una adecuada lubricación de las superficies articulares (Lumsden y col 1996) e intervenir en el intercambio de agua y metabolitos entre la red vascular y la cavidad articular (McIlwraith 2001).

Durante un proceso patológico, en el cual se produce una alteración tanto física como química del LS, se generan serios daños a nivel del cartílago articular y subsecuentemente en el hueso subcondral, los cuales pueden llegar a ser irreversibles (McIlwraith 2001).

3.3 Obtención de LS

La recolección de LS se puede realizar mediante una punción articular, denominada artrocentesis (Lasta y col 1995). Previamente se debe realizar un método de sujeción adecuado, en ocasiones es necesario la administración de un sedante, tranquilizante o la aplicación de anestésicos locales. Se debe trabajar con estricta asepsia de la zona que será abordada, a fin de no producir infecciones posteriores o alterar la muestra a analizar (Lasta 1998).

La artrocentesis es un procedimiento que se debe realizar con sumo cuidado para minimizar el riesgo de contaminación de la articulación y además tratando de no producir una ruptura de los vasos sanguíneos los cuales pueden generar una contaminación de la muestra, debido a que puede entregar datos erróneos de los distintos componentes, tanto celulares como químicos. Las muestras de LS pueden tomarse con o sin anticoagulante. Si la muestra se obtiene con anticoagulante, se puede utilizar EDTA sódico, lo cual se utiliza preferentemente para la realización de exámenes citológicos (Lasta 1998, McIlwraith 2001).

3.4 Examen del Líquido Sinovial

El análisis de fluido articular integra uno de los métodos complementarios de exploración más utilizados para determinar la presencia de procesos inflamatorios o degenerativos, que se originan primeramente en la membrana sinovial o en el cartílago articular (Lasta 1998). Desde el punto de vista diagnóstico, se pueden realizar varios análisis al LS, siendo los exámenes más realizados el físico, químico, microbiológico, inmunológico, citológico y medición de elementos inorgánicos.

3.4.1 Examen físico de LS

El examen físico es simple de realizar y se puede practicar al momento de obtener la muestra y en ella se pueden determinar los siguientes parámetros:

3.4.1.1 Color y Turbidez. El color del LS sin alteraciones es amarillo claro y libre de cualquier tipo de flóculos. La presencia de opacidad y de material floculento es un indicador de sinovitis (Lasta 1998), la cual, asociada a una artritis séptica, resulta en una muestra serofibrinosa o fibrinopurulenta (McIlwraith y col 2001). Una hemorragia producida por un traumatismo nos dará un líquido amarillo oscuro o color ámbar (xantocromico) (Lasta 1998). Una situación similar se aprecia en una articulación infectada, en la cual el LS es sanguinolento, debido a la hemorragia producida por el severo daño de la membrana sinovial (McIlwraith y col 2001). Estos cambios son variables y, en general, mínimos en las enfermedades degenerativas crónicas y OCD (osteocondrosis disecante), pero son más marcadas en sinovitis agudas, ya sean traumáticas o sépticas (McIlwraith 2001).

3.4.1.2 Viscosidad. La viscosidad del LS está directamente relacionada con su contenido de ácido hialurónico y es un marcador de la cantidad y calidad del hialuronato presente (Lumsden y col 1996). La viscosidad se puede medir observando el LS al caer de la jeringa, en un fluido normal la gota se estira aproximadamente 5 a 7 cm antes de cortarse, si el fluido se corta con la facilidad del agua esto nos indica una baja viscosidad (McIlwraith y col 2001). Otra prueba utilizada con frecuencia es colocar una gota de LS en el dedo pulgar, luego tocarla con el índice y separar ambos dedos, en un LS normal se produce una separación de 2,5 a 5 cm antes de cortarse (Feldman 1984, McIlwraith y col 2001). Si bien se ha visto que en una articulación con algún grado de inflamación disminuye la viscosidad del LS, no es un examen que nos entregue información fidedigna, debido al gran número de variables que afectan esta propiedad del LS (McIlwraith y col 2001).

3.4.1.3 Volumen. El volumen de LS está incrementado en la mayoría de las sinovitis activas. Una disminución de este se da en casos de una enfermedad degenerativa crónica de la articulación y se puede manifestar como una “articulación seca”, la cual puede estar asociada con una membrana sinovial fibrótica (Ekman y col 1981). En casos de efusión idiopática también se da un aumento de volumen de LS como es el caso de efusión idiopática de la articulación tibio-tarsal (bog spavin) (Rorvik y Grondahl 1995, McIlwraith 2001).

3.4.1.4 Presencia de fibrina. Normalmente el LS no coagula, esta propiedad se debe a la ausencia de fibrinógeno, así como también de otros factores de la coagulación como son la protrombina, el factor V, factor VII y la tromboplastina (McIlwraith 2001). El LS patológico coagula y el tamaño del coagulo es proporcional al daño articular (Feldman 1984, Lasta y col 1995).

3.4.2 Examen químico de LS. El examen químico nos entrega valiosa información sobre el estado de la articulación y el progreso de las diferentes enfermedades articulares, ya que mediante este examen se pueden medir marcadores biológicos (biomarcadores) del metabolismo articular (McIlwraith y col 2001). A continuación se enumeran los análisis más importantes realizados mediante este examen:

3.4.2.1 Enzimas. Se han realizado trabajos en los cuales se han determinado diferentes enzimas con el fin de evaluar su actividad en el LS y su correlación con el daño articular, para así poder utilizarlas como biomarcadores (Billinghurst 2003), entre las enzimas que se han medido se encuentran: lactato deshidrogenasa, metaloproteasas, aspartato amino transferasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, catepsina, lisozimas (Lasta 1998), transaminasa glutámico-oxalacética (Coppo y col 1988), proteasas (Lohmander y col 1993) y lipasa (McIlwraith 2001).

Según McIlwraith y col (2001) el incremento en la actividad enzimática en el LS puede ser el resultado de varios mecanismos:

- 1) La liberación de enzimas por parte de los leucocitos
- 2) la liberación de enzimas por parte del tejido necrótico o inflamado
- 3) producción y liberación de un incremento de enzimas por el tejido sinovial afectado.

3.4.2.2 Concentración de proteínas totales. Las proteínas del LS son aproximadamente 25-30% de las proteínas totales del plasma del mismo animal. Generalmente se acepta que un LS normal tenga una concentración de proteínas igual o menor a 2 gr/dL (McIlwraith y col 2001). El LS, en comparación con el plasma, posee mayores concentraciones de albúmina, una menor concentración de α_2 y γ globulina y una cantidad reducida de haptoglobulinas y proteínas de alto peso molecular (McIlwraith y col 2001). En un proceso inflamatorio la cantidad de proteínas puede llegar a ser la misma que en el plasma, disminuyendo la cantidad de albúmina, aumentando las α_2 y γ globulinas y aumentando las cantidades de fibrinógeno (McIlwraith y col 2001).

Una simple estimación de la concentración de proteínas totales es suficiente para un análisis de rutina, un animal que presente concentraciones por sobre los 2,5 gr/dL nos indica alguna anormalidad, ahora si este posee valores de 4 gr/dL esto nos indica una severa inflamación. Sin embargo, estos análisis deberían compararse con articulaciones sanas del mismo animal, debido a que se ha demostrado un aumento en las concentraciones de proteínas en los equinos que se encuentran en competencia (McIlwraith y col 2001).

3.4.2.3 Determinación del coagulo de mucina. La mucina es una glucoproteína ácida constituyente de la porción polisacárida del ácido hialurónico, la cual ayuda a la lubricación de

la articulación e interviene además en el intercambio de agua y metabolitos entre la red vascular y la cavidad articular (Lasta 1998). La determinación de la cantidad de mucina es evaluada adicionando 0,5 ml de LS en 2 ml de ácido acético al 2% y mezclándolo rápidamente, obteniendo de este proceso un coágulo de mucina. Un coágulo de mucina normal es aquel que presenta una forma de masa viscosa compacta en una solución clara, en cambio una masa más suave con fragmentos en la solución nos indica un “falso” coágulo de mucina, siendo un pobre coágulo de mucina aquel que muestra fragmentos y pequeñas masas en una solución turbia (McIlwraith, 2001).

3.4.3 Examen inmunológico de LS

Recientemente se han realizados numerosos estudios en los cuales se utilizan marcadores inmunológicos los cuales parecen ser los más sensibles a la hora de identificar y cuantificar los componentes del cartílago articular (McIlwraith 2001). Anticuerpos policlonales contra diferentes epítopes de agregán han sido producidos, así como también contra diferentes componentes del cartílago articular (Fuller y col 1996, Chávez 2006).

3.4.4 Examen citológico de LS

En el examen citológico generalmente se realizan recuentos leucocitarios, ya que cambios cualitativos y cuantitativos en éstos pueden darnos una información del grado de inflamación que posee la membrana sinovial (McIlwraith 2001). Se han obtenido valores leucitarios de referencia en LS de 167 ± 87 cel/mm³ (McIlwraith y col 2001). En casos de sinovitis idiopática y osteocondritis disecante se han encontrado valores de 1000 cel/mm³, aun cuando estas enfermedades son consideradas como no inflamatorias (McIlwraith y col 2001). En artritis traumática y osteoartritis se han encontrado rangos bastante amplios de células inflamatorias los cuales van de 5.000 a 10.000 cel/mm³ (McIlwraith y col 2001).

Los eritrocitos no son un componente normal del LS y su presencia en pequeñas cantidades se atribuye a errores en la artrocentesis (Lasta 1998).

3.4.5 Examen de elementos inorgánicos en LS

Un examen que se realiza, mas que rutinariamente en forma experimental, es el examen de elementos inorgánicos, siendo los mas estudiados los radicales libres, debido al aumento de éstos en procesos inflamatorios (Van den Boom y col 2005).

3.5 Urea

La urea es una molécula pequeña formada en el hígado durante el ciclo de la urea de Krebs-Henseleit, por la condensación irreversible de dos moléculas de amonio, las cuales son liberadas durante el catabolismo proteico, más una de dióxido de carbono (Barton y Morris 1998). La urea posee un peso molecular de 60 gr/mol, por lo que atraviesa la mayoría de las membranas de forma pasiva, esto permite que logre alcanzar un rápido equilibrio entre las concentraciones séricas y de diferentes fluidos corporales (Chávez 2006).

Debido a lo anterior se han realizado numerosos estudios los cuales han mostrado que las concentraciones de urea encontrada en las paredes alveolares (Rennard y col 1986,

Zedtwitz-Liebenstein y col 2005), así como también en el LS (Kraus y col 2002, Gough y col 2002, Budsberg y col 2006, Chávez 2006) se encuentra en equilibrio con las concentraciones plasmáticas. La urea no presenta cambios a pH fisiológico así como tampoco es consumida ni producida por células pulmonares ni sinoviales. Con respecto a lo anterior y debido a la simplicidad de su medición, es que la urea se ha utilizado con bastante frecuencia como marcador de dilución en lavados broncoalveolares (LBA) (Zedtwitz-Liebenstein y col 2005) y recientemente en muestras de LS (Kraus y col 2002, Gough y col 2002, Budsberg y col 2006, Chávez 2006).

Si bien la urea se ocupa ampliamente como marcador de dilución en LBA, por ser uno de los medios más simples para calcular dilución (Bayat y col 2004), esta ha tenido sus detractores, debido a que se estima que la eficacia del método depende del tiempo de recuperación del fluido instilado, ya que al ser la urea una molécula pequeña esta difunde rápidamente en el fluido del LBA durante el proceso, llevando esto a una sobre-estimación del volumen de fluido epitelial recuperado (Kirschvink y col 2001), lo cual también podría producirse en técnicas de lavados articulares, sin embargo no se han realizado estudios que demuestren este supuesto.

La urea como marcador de dilución de LS ha sido utilizada experimentalmente en equinos (Gough y col 2002), como marcador de dilución en articulaciones con fragmentos osteocondrales (Chávez 2006), así como en perros (Kraus y col 2002) con osteoartritis inducida (Budsberg y col 2006).

En este estudio se determinarán las concentraciones de urea plasmática y sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal en equinos clínicamente sanos, pertenecientes al Club Hípico de Concepción, para obtener la correlación existente entre ellas. Estos datos serán de utilidad para futuros estudios que deseen utilizar la urea como factor de dilución, y así determinar con un menor grado de error las concentraciones de metabolitos presentes en LS.

3.6 Hipótesis

Las concentraciones de urea sérica y la presente en el líquido sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal en equinos fina sangre de carrera clínicamente sanos no poseen diferencias estadísticamente significativas.

3.7 Objetivos

3.7.1 Objetivos Generales

Evaluar las concentraciones de urea sérica y sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal en equinos fina sangre de carrera clínicamente sanos.

3.7.2 Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de urea sérica y sinovial de la articulación intercarpal y tibio-tarsal.

- Comparar las concentraciones de urea sérica, sinovial intercarpal y sinovial tibio-tarsal.
- Correlacionar las concentraciones de urea sérica con la concentración de urea sinovial de la articulación intercarpal y tibio-tarsal.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material biológico

El presente estudio se realizó entre los meses de abril y mayo de 2006, en instalaciones del Club Hípico de Concepción S. A. Hualpén, Chile. Se utilizaron 39 Equinos Fina Sangre Inglés de Carrera, con un rango de edad y peso entre 2 - 7 años y 420 - 470kg.

4.1.2 Material de muestreo

- 60 jeringas de 5 ml
- 30 jeringas de 10 ml
- 60 tubos de ensayo heparinizados
- 30 tubos de ensayo para la obtención de suero
- 90 tubos ependorf
- Povidona Iodada 10%
- Alcohol 96°

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Selección de animales.

A los 39 equinos de este estudio se les realizó un examen clínico general, descartándose los animales clínicamente enfermos, luego de esto se practicó un examen especial de aparato locomotor, realizando las pruebas de palpación-presión y flexión-extensión en las articulaciones a estudiar a fin de determinar la presencia de dolor o efusión articular, animales que presentaron alguna anomalía en este examen fueron descartados de este estudio, finalmente al momento de la toma de muestra de LS se realizó un examen físico de éste, examen en el cual se observó el color, la turbidez, la viscosidad y la posible formación de coagulos en las muestras, siendo los animales que presentaron una anomalía en este examen, descartados de este estudio. De la totalidad de equinos presentes en el estudio, 9 presentaron alguna anomalía en los exámenes mencionados, siendo estos descartados de este estudio (anexo 1).

4.2.2 Obtención y manejo de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante venopunción yugular, obteniendo 10 ml de sangre. Las muestras obtenidas se depositaron en tubos de ensayo siendo posteriormente centrifugadas en dependencias del Club Hípico de Concepción para la obtención de suero, el cual se almacenó en tubos Ependorf, y posteriormente congelados a -70°C en dependencias del Instituto de Inmunología de la Universidad de Concepción. Luego las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

4.2.3 Obtención y manejo de muestras de LS

Para la obtención de LS se realizó la desinfección de la cara dorsal de la articulación intercarpal y tibio-tarsal izquierdas, con una mezcla de alcohol y povidona yodada, realizando posteriormente una artrocentesis mediante la cual se obtuvo 1 a 2 ml de LS. La artrocentesis de la articulación intercarpal se realizó en la cara dorso lateral, mientras que en la articulación tibio-tarsal se realizó en la cara dorso medial, distal al maleolo medial de la tibia. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos heparinizados siendo centrifugadas en dependencias del Club Hípico de Concepción, posteriormente fueron depositadas en tubos Ependorf y congeladas a -70°C en dependencias del Instituto de Inmunología de la Universidad de Concepción. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

4.2.4 Método analítico

4.2.4.1 Urea: La concentración de urea se expresó en mmol/L, se determinó en un autoanizador Cobas Mira Plus a través del método GLDH enzimático para determinaciones cinéticas de urea¹ medido a 340 nm y 37°C .

4.3 ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Statistix 8.0, siendo los datos presentados en planillas del programa Excel 5.0.

Los datos se describieron a partir de su promedio y sus desviaciones estándar, siendo la comprobación de los supuestos evaluados mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y Barlette. La comparación entre las concentraciones séricas y sinoviales de urea se realizó mediante un test de t pareado.

La asociación entre las concentraciones de urea sérica y las obtenidas en la articulación intercarpal y tibio-tarsal se analizaron mediante la prueba de asociación de Pearson.

¹ Urea liquiUV, artículo 10521 Human

5. RESULTADOS

5.1 CONCENTRACIONES DE UREA SÉRICA Y SINOVIAL

La concentración de urea sérica presentó un valor promedio de $5,7 \pm 1,7$ mmol/L, valor similar a los encontrados en las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal ($P > 0,05$), en las cuales se obtuvo una concentración de urea de $6,5 \pm 2,3$ mmol/L y $5,6 \pm 2,1$ mmol/L respectivamente, como se puede apreciar en la figura 1.

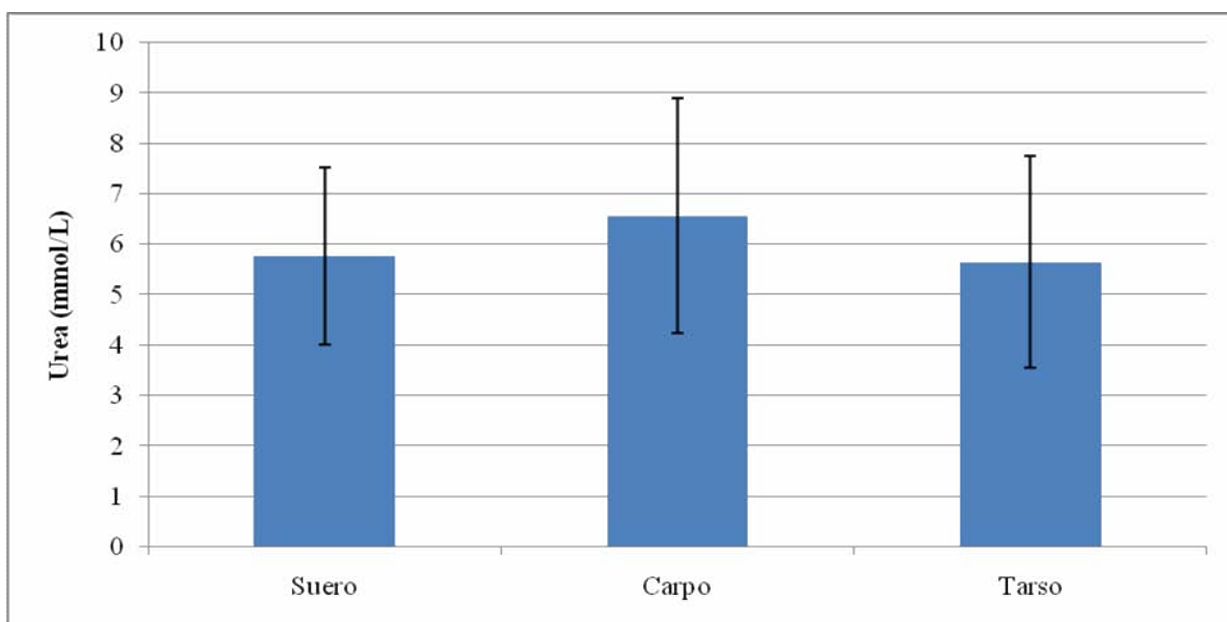


Figura 1. Concentraciones promedio de urea (\pm DE) en suero y líquido sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal en equinos ($n = 30$)

5.2 COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE UREA

El análisis de Pearson determinó que las concentraciones séricas de urea se correlacionan alta y positivamente con las concentraciones sinoviales de la articulación tibio-tarsal ($r = 0,879$) ($P = 0,00$) e intercarpal ($r = 0,78$) ($P = 0,00$), como se muestra en las figuras 2 y 3 respectivamente.

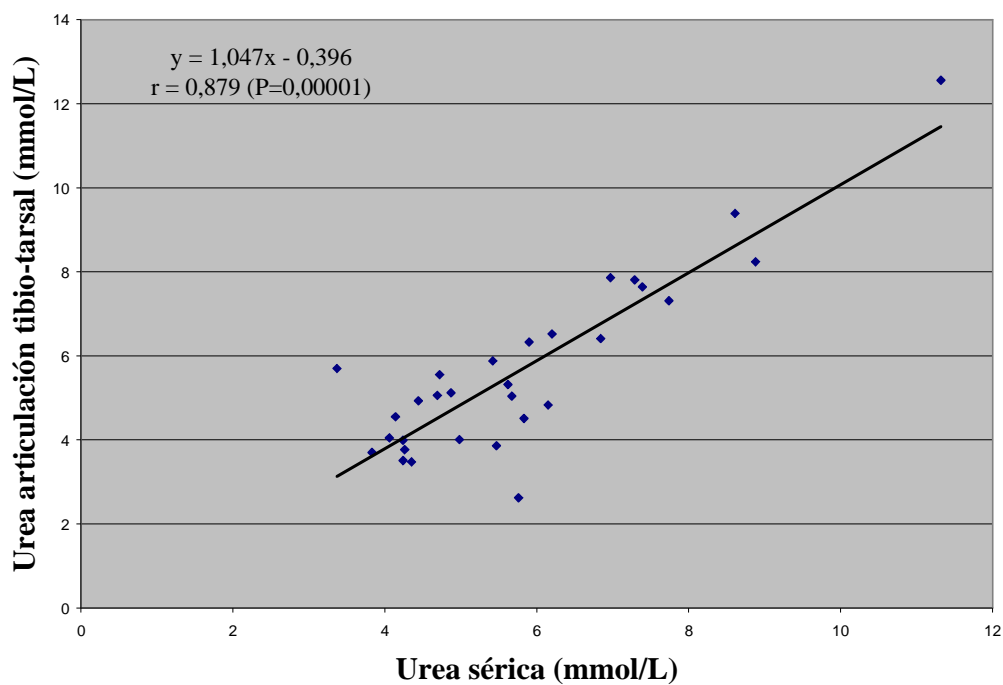


Figura 2. Correlación y regresión entre concentraciones de urea sérica y concentraciones de urea sinovial de la articulación tibio-tarsal en equinos (n= 30).

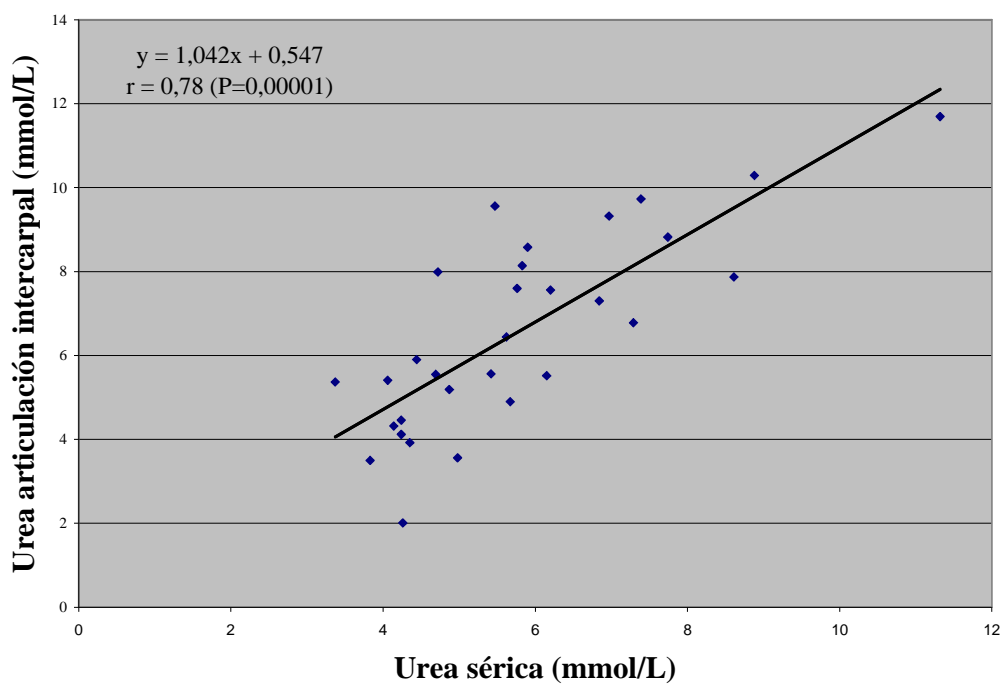


Figura 3. Correlación y regresión entre concentraciones de urea sérica y concentraciones de urea sinovial de la articulación intercarpal en equinos (n= 30).

6. DISCUSIÓN

La urea es una molécula pequeña formada en el hígado a partir dos moléculas de amonio, las cuales provienen del catabolismo proteico (Barton y Morris 1998). Ésta molécula es excretada en un 75% a 100% por el riñón, siendo de menor importancia la excreción por sudor o por vía gastrointestinal (Dimski 1994). Las concentraciones de urea sanguínea dependen de la edad, dieta, función hepática y renal. Se producen descensos en sus concentraciones sanguíneas debido a una dieta baja en proteínas, falla hepática y así como también por el uso de esteroides anabólicos (Barton y Morris 1998). Aumentos de urea sanguínea están asociados principalmente insuficiencia renal, aumento de la ración de proteínas en la dieta o por un aumento del catabolismo proteico (Barton y Morris 1998). Las concentraciones de urea sérica encontradas en este estudio fueron de $5,7 \pm 1,7$ mmol/L, las cuales coinciden con Wittwer (1983) quien establece que las concentraciones de urea séricas para equinos del sur de Chile se encuentran entre los 3,6 y 8,8 mmol/L. Esto coincide además con Chávez (2006), quien determinó en equinos clínica y radiológicamente sanos pertenecientes al mismo establecimiento hípico en que se realizó este estudio las concentraciones de urea sérica, obteniendo un valor de $4,0 \pm 0,8$ mmol/L.

Las concentraciones de urea sinovial en las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal presentaron un valor de $6,5 \pm 2,3$ mmol/L y $5,6 \pm 2,1$ mmol/L respectivamente, estos valores se encuentran dentro del rango de referencia en equinos descrito por Gough y col (2002), quienes determinaron que la urea sinovial se encuentra entre los 2,5 y 7,7 mmol/L, dicho rango se determinó a partir de las mediciones realizadas en siete diferentes articulaciones de 42 equinos. Así mismo, Chávez (2006) determinó que la concentración de urea en la articulación carpal proximal en equinos clínica y radiológicamente sanos presenta un valor de $4,2 \pm 1,0$ mmol/L.

En el presente estudio se estableció una correlación alta y positiva entre las concentraciones de urea sérica y sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal, lo cual coincide con lo encontrado por Gough y col (2002), quienes establecieron una correlación similar. Conjuntamente, Chávez (2006) estableció una correlación alta y positiva entre las concentraciones de urea sérica y sinovial de la articulación carpal proximal en diez equinos clínica y radiográficamente sanos. Lo anteriormente planteado se debe a que la urea no es sintetizada ni degradada normalmente en la cavidad sinovial (Kohn y Hansen 1998), ya que para la producción de ésta es necesario el ciclo de la arginina, ciclo que se realiza exclusivamente en el hígado (Dimski 1994), siendo la urea sinovial proveniente del filtrado plasmático realizado en la membrana sinovial. La urea es una molécula pequeña que atraviesa de forma pasiva las membranas, en este sentido Wittwer y col (1993) establecen que las concentraciones de urea en leche bovina son las mismas que las encontradas en el suero, conjuntamente, se ha reportado que las concentraciones de urea en lagrimas de equinos poseen valores similares a las concentraciones de urea sérica (Zapata y col 2005). Adicionalmente, en lavados broncoalveolares la urea se ha utilizado con bastante frecuencia como marcador de

dilución, debido a que ésta logra similares concentraciones en el fluido epitelial pulmonar y en suero (Zedtwitz-Liebenstein y col 2005). De manera similar la urea logra atravesar la membrana sinovial de forma pasiva, logrando un equilibrio entre las concentraciones séricas y sinoviales, siendo utilizada ésta como marcador de dilución de LS (Kraus y col 2002, Gough y col 2002, Budsberg y col 2006, Chávez 2006).

Por otra parte, existen estudios en los cuales se ha determinado la concentración de urea articular en animales con patologías específicas, como el realizado por Kraus y col (2002), en perros, en los cuales se generó una sinovitis aguda mediante la inyección de quimiopapaina. De igual forma según Chávez (2006) quien determinó las concentraciones de urea en equinos con fragmento osteocondral estableció una respuesta similar. En ambos trabajos las concentraciones de urea sinovial fueron menores que las concentraciones de urea sérica, presentando los animales de ambos estudios efusión articular, lo cual causa una disminución en las concentraciones de urea sinovial de esas articulaciones (Kraus y col 2002, Gough y col 2002, Budsberg y col 2006, Chávez 2006). La dinámica de fluidos un importante factor que determina la composición del LS, siendo la eficiencia del intercambio entre la membrana sinovial, los capilares y la cavidad articular, dependiente de la densidad de los capilares, la profundidad de estos y el flujo sanguíneo (Bertone 2004), siendo este intercambio alterado en procesos patológicos (McIlwraith 2001). Al ser los capilares sinoviales en su mayoría fenestrados, la barrera que impide el paso de los elementos sanguíneos hacia la cavidad articular esta dada principalmente por los sinoviocitos, siendo los de tipo B los mas importantes en esta tarea, debido a que poseen procesos membranosos que tienden a cubrir delicadamente la superficie de la lamina sinovialis intima, y así aislar la cavidad sinovial (Iwanaga y col 2000). Otro factor que impide el ingreso de elementos sanguíneos hacia la cavidad sinovial es el hialuronato presente en el LS, el cual proporciona una barrera contra el ingreso de grandes moléculas, ingresando de forma pasiva hacia la cavidad articular moléculas pequeñas como es el caso de la urea (McIlwraith 2001). Las articulaciones de este estudio presentaron concentraciones de urea sinovial y sérica similares entre si, a diferencia de los estudios anteriormente mencionados, lo cual nos muestra que las articulaciones de este estudio se encuentran sin anomalías en la dinámica de fluidos ni en la membrana sinovial que produzcan alteraciones en las concentraciones de urea sinovial de las articulaciones estudiadas.

6.2 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos y en concordancia en que se ha realizado el experimento es posible concluir:

Las concentraciones de urea sérica y sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal en equinos fina sangre de carrera clínicamente sanos no poseen diferencias estadísticamente significativas.

Las concentraciones de urea sinovial de equinos fina sangre de carreras clínicamente sanos esta asociada a las concentración de urea sérica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Barton M H, D D Morris. 1998. Disease of the liver. En: Reed S M, Bayly W M (eds). *Equine internal medicine*. W B Saunders, Philadelphia. Pp 707-738.
- Bayat S, K Louchahi, B Verdière, D Anglade, A Rahoui, P M Sorin, M Tod, O Petitjean, F Fraisse, F A Grimbert. 2004. Comparison of ^{99m}Tc -DTPA and urea for measuring cefepime concentration in epithelial lining fluid. *Eur Respir J* 24, 150-156.
- Bertone A L. 2004. Joint physiology: responses to exercise and training. En: Hinchcliff K W, Kaneps A J, Geor R J, Bayly W (eds). *Equine sport medicine and surgery*. W. B. Saunders, Philadelphia. Pp 152-160.
- Billinghurst R C. 2003. Biomarkers of joint disease. En: Robinson N E, Wilson M R (eds). *Current therapy in equine medicine*. W B Saunders, Philadelphia. Pp 513-520.
- Budsberg S C, M E Lenz, E A Thonar. 2006. Serum and synovial fluid concentrations of keratan sulfate and hyaluronan in dogs with induced stifle joint osteoarthritis following cranial cruciate ligament transaction. *Am J Vet Res* 67, 429-432.
- Coppo J A, G L Sandoval, O A Pérez, S H de Scorza, E R Papel. 1988. Análisis del líquido sinovial para la tipificación de artropatías del equino. *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 69, 77-87.
- Chavez H. 2006. Concentración de epítotope CS-846 y actividad de deshidrogenasa láctica y fosfatasa alcalina en suero y líquido sinovial de caballos portadores de fragmento osteocondral en la articulación carpal. *Tesis M. Sc.*, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- De Bruin T, H de Rooster, H van Bree, E Cox. 2005. Use of vitamin B12 in joint lavage for determination of dilution factors of canine synovial fluid. *AJVR* 66, 1903-1906.
- Dimski D S. 1994. Ammonia metabolism and the urea cycle: Function and clinical implications. *J Vet Intern Med* 8, 73-81.
- Ekman L, G Nilsson, L Persson, J H Lumsden. 1981. Volume of Sinovia in Certain Joint Cavities in the Horse. *Acta Vet Scand* 22, 23-31.
- Feldman B F. 1984. Examen de laboratorio del líquido sinovial. En: *Cursillo de actualización de citología clínica en veterinaria*. Facultad de ciencias veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Pp 49-55.

- Fuller C J, A R S Barr, P A Dieppe, M Sharif. 1996. Variation of an epitope of keratan sulphate and total glycosaminoglycan in normal equine joints. *Equine Vet J* 28, 490-493.
- Gough M R, G A Munroe, I G Mayhew. 2002. Urea as a measure of dilution of equine synovial fluid. *Equine Vet J* 34, 76-79.
- Iwanawa T, M Shikichi, H Kitamura, H Yanase, K Nozawa-Inoue. 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63, 17-31.
- Kidd J A, C Fuller, A R S Barr. 2001. Osteoarthritis in the horse. *Equine vet ed* 13, 160-168.
- Kirschvink N, L Fiévez, S Dogné, F Bureau, T Art, P Lekeux. 2001. Comparison of inulin with urea as dilutional markers of bronchoalveolar lavage in healthy and heaves-affected horses. *Vet Res* 32, 145-154.
- Kitamura H P, H Yanase, H Kitamura, T Iwanaga. 1999. Unique localization of protein gene product 9.5 in type B synoviocytes in the joint of the horse. *J Histo Cyto* 47, 343-351.
- Konh C W, B Hansen. 1998. Polyuria and Polydipsia. En: Reed S M, Bayly W M (eds). *Equine internal medicine*. Pp 126-132. W B Saunders, Philadelphia.
- Kraan M C, Haringan J J, Post W J, Versendaal J, Breedveld F C, Tak P P. 1999. Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. *Rheum* 38, 1074-1080.
- Kraus V B, J L Huebner, C Fink, J B King, S Brown, T P Vail, F Guilak. 2002. Urea as a passive transport marker for arthritis biomarker studies. *Arth Rheum* 46, 420-427.
- Lasta G E, R E Tarabuso, J N Andreatta. 1995. Estudio del líquido sinovial de bovinos y equinos. Primera Parte. *Clín Prod Vet* 24, 2-9.
- Lasta G E. 1998. Bibliographic revision of synovial fluid. New aspect related with proteoglycans and glycosaminaglycans. *Anal vet* 18, 83-98.
- Lein C E, O A Iglesias Elizondo. 1985. Examen del líquido sinovial. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 19, 237-248.
- Lohmander S L, L A Hoerrner, M W Lark. 1993. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human oostearthritis. *Arthritis Rheum* 36, 181-189.
- Lumsden J M, J P Caron, J F Steffe, J L Briggs, S P Arnoczky. 1996. Apparent viscosity of the synovial fluid from mid-carpal, tibiotarsal, and distal interphalangeal joints of horses. *Am J Vet Res* 57, 879-883.

- Mäkelä O. 2005. Radiation sinovectomy with Holmium-166 ferric hydroxide macroaggregate. *Tesis M V*, Faculty of Veterinary Medicine Helsinki. Helsinki University. Finlandia.
- McIlwraith C W. 2001. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. *AAEP proceed* 47, 142-156.
- McIlwraith C W, R C Billingham, D D Frisbie. 2001. Current and future diagnostic means to better characterize osteoarthritis in the horse – routine synovial fluid analysis and synovial fluid and serum markers. *AAEP Proceedings* 47, 171-179.
- Olivier A, J P Nurton, A J Guthrie. 1997. An epizootological study of wastage in thoroughbred racehorses in Gauteng, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 68, 125-129.
- Pool R R. 1996. Pathologic manifestations of joint disease in the athletic horse. En: McIlwraith C W, Trotter G W (eds). *Joint disease in the horse*. W B Saunders, Philadelphia. Pp 87-104.
- Rennard S I, G Basset, D Lecossier, K M O'Donnell, P Pinkston, P G Martin, R G Crystal. 1986. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 60, 532-538.
- Rorvik A M, A M Grondahl. 1995. Markers of osteoarthritis: A review of the literature. *Vet Surg* 24, 255-262.
- Rosdale P D, R Hopes, N J Wingfield, K Offord. 1985. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec* 116, 66-69.
- Todhunter R J, G Lust. 1990. Pathophysiology of synovitis: Clinical signs and examination in horses. *Comp cont educ pract vet* 12, 980-992.
- Todhunter R J. 1996. Anatomy and physiology of synovial joints. En: McIlwraith CW, Trotter GW (eds). *Joint Disease in the horse*. WB Saunders, Philadelphia. Pp 1-28.
- Trotter G W, C W McIlwraith. 1996. Clinical features and diagnosis equine joint disease. En: McIlwraith CW, Trotter GW (eds). *Joint Disease in the horse*. WB Saunders, Philadelphia. Pp 120-145.
- Van den Boom R, C H van de Lest, S Bull, R A Brama, P R van Weeren, A Barneveld. 2005. Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. *Equine Vet J* 37, 250-256.
- Vandenabeele F, I Lambrichts, P Lippens, J Creemers. 2001. In vitro loading of human synovial membrane with 5-hydroxytryptamine: Evidence for dense core secretory granules in type B cells. *Arch Histol Cytol* 64, 1-16.

- Wittwer F. 1983. Valores de referencia en animales de compañía. En: Wittwer F, Böhmwald H (eds). *Manual de patología clínica veterinaria*. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Pp 68.
- Wittwer F, J M Reyes, H Opitz, P A Contreras, H Böhmwald. 1993. Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. *Arch Med Vet* 25, 165-172.
- Zapata G L, R M Britos, M E Pintos, E Dreizzen, N B Lausada, S Arauz. 2005. Tear ura nitrogen and creatinine levels in horse and their correlation with serum values. *Vet Ophthalmol* 8, 207-209.
- Zedtwitz-Liebenstein K, P Schenk, P Apfalter, V Fuhrmann, B Stoiser, W Graninger, E Schuster, M Frass, H Burgmann. 2005. Ventilador-associated pneumonia: Increased bacterial counts in bronchoalveolar lavage by using urea as an endogenous marker of dilution. *Crit Care Med* 33, 756-759.

8. ANEXO

Anexo 1. Concentraciones individuales de urea sérica y sinovial de las articulaciones intercarpal y tibio-tarsal de equinos clínicamente sanos (n=30).

N° de animal	Suero equinos sanos Urea mmol/L	LS de carpo de caballos sanos Urea mmol/L	LS de tarso de equinos sanos Urea mmol/L
1		DESCARTADO	
2	3,37	5,37	5,7
3	5,47	9,56	3,86
4	4,72	7,99	5,55
5	5,9	8,58	6,33
6	7,39	9,73	7,64
7	11,32	11,69	12,56
8		DESCARTADO	
9		DESCARTADO	
10	5,76	7,6	2,62
11	4,35	3,92	3,48
12		DESCARTADO	
13		DESCARTADO	
14	7,74	8,82	7,31
15	5,42	5,56	5,88
16	8,88	10,29	8,24
17	4,44	5,9	4,93
18	4,24	4,12	3,51
19	6,2	7,56	6,52
20	4,14	4,32	4,55
21	3,83	3,5	3,7
22		DESCARTADO	
23	5,67	4,9	5,04
24	6,15	5,52	4,83
25	4,24	4,46	3,99
26	8,61	7,87	9,39
27	4,98	3,56	4,01
28	7,29	6,78	7,81
29		DESCARTADO	
30		DESCARTADO	
31	4,87	5,19	5,12
32	4,69	5,55	5,06
33	6,97	9,32	7,86
34	6,84	7,3	6,41
35	5,83	8,14	4,51
36		DESCARTADO	
37	4,26	2,01	3,77
38	4,06	5,41	4,05
39	5,62	6,44	5,32

9. AGRADECIMIENTOS

Para finalizar este trabajo me gustaría agradecer a mi familia por su paciencia, apoyo y por sobre todo su amor, sin los cuales este trabajo no habría sido posible.

A mis amigos, quienes se transformaron en un pilar fundamental en mi etapa universitaria, especialmente a Sebastián Galecio Naranjo por su amistad y dedicación a este trabajo, ya que sin su ayuda éste no sería posible.