

Proteinograma do líquido sinovial de equinos hígidos obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida

Proteinogram of synovial liquid from healthy equines determined by means of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

Paula Alessandra Di Filippo^{I*} Gabriel Carvalho dos Santos^I Flávio Augusto Soares Graça^I
Andressa Francisca Silva Nogueira^{II} Aracelle Elisane Alves^{II} Aureo Evangelista Santana^{II}

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar o proteinograma do líquido sinovial de quarenta equinos hígidos. Após colheita, centrifugação e fracionamento das amostras, as proteínas de fase aguda foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo SDS-PAGE, e suas concentrações determinadas por densitometria computadorizada. Foram encontradas 16 a 26 proteínas no fracionamento eletroforético, com peso molecular variando de 16 a 238.000 Daltons (Da). Os pesos moleculares encontrados, correspondentes às proteínas mais conhecidas, foram albumina, 63.000Da; ceruloplasmina, 113.000Da; transferrina, 80.000Da; haptoglobina, 40.000Da; α -1-glicoproteína ácida, 37.000Da; IgA, 189.000Da e IgG, 74.000Da. O estabelecimento do proteinograma do líquido sinovial de equinos hígidos pode trazer contribuição significativa ao diagnóstico, tratamento e prognóstico de animais com alterações articulares.

Palavras-chave: cavalo, artrite, eletroforese.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the proteinogram of the proteins included in the synovial fluid of forty healthy horses. After collection, centrifugation and fractionation of the samples, the acute phase proteins were separated by electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS-PAGE, and their concentrations were determined by computerized densitometry. It was found 16 to 26 proteins on the electrophoretic fraction, with molecular weights from 16 to 238.000 Daltons (Da). The molecular weights found, corresponding to most known proteins were albumin, 63,000Da; ceruloplasmin, 113.000Da; transferrin, 80,000Da; haptoglobin, 40.000Da, α -1-acid glycoprotein, 37.000Da; IgA, IgG and 189.000Da, 74.000Da. The knowledge proteinogram of synovial fluid of healthy horses

can bring significant contribution to the diagnosis, treatment and prognosis of animals with articular changes.

Key words: horse, arthritis, electrophoresis.

INTRODUÇÃO

O líquido sinovial (LS) existente nas cavidades articulares e bainhas tendíneas é um dialisado do plasma, modificado pela produção de ácido hialurônico pela membrana sinovial, com as funções de nutrir a cartilagem articular e lubrificar as superfícies articulares, minimizando o atrito natural entre cartilagens opostas e auxiliando no suporte mecânico e na absorção de impacto (CLYNE, 1987). É livre de material floculento ou fragmentos, possui coloração de clara à palha amarelada e contém ácido hialurônico, eletrólitos, glicose, enzimas e proteínas. As proteínas do plasma atravessam a barreira hematosinovial em quantidades inversamente proporcionais ao seu peso molecular e seus valores normais estão entre 0,92 a 2,5gdl⁻¹ (MAHAFFEY, 1992).

A claudicação, frequente nos cavalos atletas, representa um aspecto importante na Medicina Veterinária Equina e cerca de 33% das claudicações devem-se a enfermidades articulares. Tais enfermidades podem limitar severa e permanentemente o desempenho atlético desses animais (HONNAS et al., 1991). Diante desse

^ILaboratório de Clínicas e Cirurgia Animal (LCCA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" (UENF), Avenida Alberto Lamego 2000, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: pdf@uenf.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil.

contexto, a análise do LS pode fornecer informações capazes de indicar a natureza e a extensão das lesões intra-articulares e contribuir com outras técnicas auxiliares na elaboração do diagnóstico, na definição da terapia e no seu acompanhamento, possibilitando o estabelecimento de prognóstico fidedigno (TROTTER & McILWRAITH, 1996).

As proteínas de fase aguda (PAF), componentes não específicos do sistema imune, são cada vez mais utilizadas como biomarcadores de prognóstico e no monitoramento das respostas a tratamentos, juntamente com determinantes gerais da saúde dos equinos. Sabe-se que estas contribuem para o restabelecimento da homeostase, limitando o crescimento bacteriano de forma independente dos anticorpos, que aparecem logo após a instalação de processos inflamatórios, infecção, trauma cirúrgico, estresse e neoplasias (MURATA et al., 2004). A constatação da presença de isoformas específicas de amiloide A no líquido sinovial de equinos com artrite induzida por lipopolissacarídeos confirmou a síntese local de PAF, semelhante ao que já havia sido demonstrado previamente em humanos (JACOBSEN et al., 2006). Importantes esclarecimentos sobre a fisiopatologia da artrite poderão advir diante da confirmação da síntese intra-articular das PFAs, sendo necessário, entretanto o conhecimento de seus valores normais para viabilizar a interpretação das amostras alteradas. Assim, o objetivo deste estudo foi estabelecer o proteinograma do líquido sinovial de equinos hígidos, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 equinos sem raça definida, 20 machos e 20 fêmeas, adultos e hígidos, selecionados com base na inexistência de doença sistêmica e músculo esquelética, ausência de claudicação e quaisquer alterações ou dor evidenciadas à palpação e exame do sistema locomotor.

Imediatamente antes da colheita de líquido sinovial, foram colhidas amostras de sangue venoso através da punção da jugular. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis sem anticoagulante e após sinérese, envasadas e armazenadas adequadamente até o momento das determinações eletroforéticas. O líquido sinovial foi obtido por artrocentese da articulação radiocárpica, segundo técnica descrita por STASHAK (2002), utilizando-se agulha hipodérmica 25x8 e seringas de 5ml descartáveis. As amostras foram acondicionadas

em frascos estéreis sem anticogulante, refrigeradas e encaminhadas ao laboratório.

As concentrações das proteínas presentes no LS e no sangue foram obtidas pelo método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes para diagnósticos^a e leituras espectrofotométricas^b. Para o fracionamento das proteínas, utilizou-se eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinadas por densitometria computadorizada^c. Para o cálculo do peso molecular, foram utilizados marcadores^d de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20kDa, além das proteínas purificadas^d: albumina, α_1 -antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e imunoglobulina G (IgG).

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, para estabelecimento de média e desvio padrão dos parâmetros avaliados, utilizando-se o *Statistical Analysis System* (SAS, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No líquido sinovial, o método de fracionamento de proteínas por eletroforese permitiu identificar 16 a 26 proteínas com pesos moleculares que variaram entre 16 a 238kDa. Destas, sete foram identificadas nominalmente (Tabela 1), sendo a transferrina (80kDa), a albumina (63kDa), a haptoglobina (40kDa), a α -1-glicoproteína ácida (37kDa), a IgA (189kDa), a IgG (74kDa), a ceruloplasmina (113kDa) e uma proteína considerada como de fase aguda, com peso molecular correspondente a 23kDa (P23) e não identificada nominalmente na literatura. No sangue, verificou-se a presença de 22 a 25 proteínas com pesos moleculares que variaram entre 16 a 266kDa. Dentre as proteínas

Tabela 1. Média e desvio-padrão das frações proteicas presentes no sangue (gdL^{-1}) e no líquido sinovial (mgdL^{-1}) da articulação radiocárpica de 40 equinos hígidos.

Variáveis	-- Valores médios \pm desvios-padrão --	
	Sangue	Líquido sinovial
Proteínas totais (gdL^{-1})	7,44 \pm 0,87	1,38 \pm 0,42
Albumina	3,93 \pm 0,58	796,77 \pm 250,40
Ceruloplasmina	0,68 \pm 0,50	0,46 \pm 0,53
Transferrina	0,34 \pm 0,13	64,12 \pm 36,20
Haptoglobina	0,81 \pm 0,41	7,75 \pm 8,97
α 1-glicoproteína ácida	0,12 \pm 0,21	0,20 \pm 0,10
Imunoglobulina A	018 \pm 0,68	4,72 \pm 2,30
Imunoglobulina G	2,12 \pm 0,49	342,38 \pm 153,80

encontradas, oito foram consideradas como proteínas de fase aguda e, destas, seis de importância para o estudo em questão, sendo identificadas nominalmente: transferrina (80kDa), albumina (63kDa), haptoglobina (41kDa), α -1-glicoproteína ácida (38kDa), IgA (175kDa), IgG (74kDa) e a ceruloplasmina (112kDa).

Os valores obtidos (média±desvio padrão) no sangue para proteínas totais, transferrina, albumina, haptoglobina, α -1-glicoproteína ácida, IgA, IgG e ceruloplasmina encontram-se dentro dos limites de normalidade para a espécie equina (Tabela 1), segundo CARAPETO et al. (2006), DI FILIPPO et al. (2010) e DI FILIPPO et al. (2011). Os resultados corroboram os dados obtidos na avaliação clínica, reafirmando a higidez orgânica dos animais avaliados.

O proteinograma do líquido sinovial de articulações híbridas se assemelhou ao subfracionamento sérico. Segundo MAHAFFEY (1992), líquidos corporais distintos possuem perfis eletroforéticos similares, entretanto, no caso do líquido sinovial, as proteínas plasmáticas devem cruzar a “barreira sangue-sinovial”, o que ocorre de forma limitada e seletiva. Ademais, sabe-se que a resposta de fase aguda (RFA) estimula tanto a produção hepática de PAFs como também, a extra-hepática através das células epiteliais, células endoteliais e do tecido conectivo (JAIN et al., 2011).

As concentrações das proteínas séricas totais ($7,44\text{gdl}^{-1}\pm 0,87$) e sinoviais ($1,38\pm 0,42\text{gdl}^{-1}$) apresentadas pelos animais assemelharam-se aos valores de referência para a espécie, descritos na literatura (MAHAFFEY, 1992). Albumina, alfa-globulinas (α -1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e haptoglobina), beta-globulinas (transferrina) e gama-globulinas (IgA e IgG) foram as PAFs identificadas no líquido sinovial (Tabela 1). A albumina é a proteína mais abundante no plasma, representando neste ensaio 52,80%. Achado semelhante foi observado no líquido sinovial (57,7%). Considerada importante reserva proteica, bem como transportadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio, hormônios e bilirrubina, participa da regulação do pH sanguíneo, atuando como ânion. É uma proteína negativa de fase aguda, que tende a diminuir sua concentração sérica diante de um processo inflamatório. Isto ocorre devido à inibição da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias e ao aumento da permeabilidade vascular, com consequente saída para os espaços extravasculares. Ademais, por ser uma das menores moléculas proteicas, sua passagem pela “barreira sangue-sinovial” é facilitada (MURATA et al., 2004).

O traçado eletroforético revelou também a presença de transferrina, glicoproteína de fase aguda

negativa responsável pelo transporte sanguíneo de ferro, presente na fração β 1-globulina. Atua no controle da absorção do ferro intestinal bem como na sua distribuição no organismo, como explicou TIZARD (2008). Possui vida média de aproximadamente oito a 10 dias e responde com rapidez a mudanças no estado nutricional, porém, suas concentrações são afetadas por várias doenças, inclusive insuficiência hepática, inflamação, insuficiência cardíaca e mudanças no metabolismo do ferro (CERÓN et al., 2005).

Dentre as alfa-globulinas, identificou-se no líquido sinovial a α -1-glicoproteína ácida (AGP), ceruloplasmina e haptoglobina. A AGP possui duas funções fisiológicas principais, a ligação com fármacos e metabólitos endógenos e a imunomodulação (MURATA et al., 2004). Ademais, é capaz de auxiliar na remoção de lipopolissacarídeos (LPS) da circulação através da ligação direta com o LPS e, assim, neutralizar sua toxicidade, como explicaram MOORE et al. (1997). Tal assertiva adquire grande relevância quando se avaliam equinos com artrite séptica. Nesse sentido, JACOBSEN et al. (2006) demonstraram que, ao injetar LPS na articulação de equinos, deflagrava-se uma intensa resposta de fase aguda (RFA) no líquido sinovial. Adicionalmente, verificaram que a resposta inflamatória foi mais intensa quando 3 μ g de LPS eram injetados, ao invés de apenas 1 μ g.

Dependendo do estímulo, a elevação sérica da AGP geralmente inicia-se cinco dias após sua ativação, atingindo o pico máximo em sete dias. Entretanto, a haptoglobina (Hp) e a ceruloplasmina (Cp) podem ser detectadas na circulação 24 horas após o trauma e suas concentrações, alcançando pico máximo em quatro dias. A Hp é considerada uma das principais PAFs em todas as espécies animais, além de ser mais sensível na detecção de processos inflamatórios do que a dosagem de fibrinogênio e a contagem de leucócitos totais e/ou diferenciais (MURATA et al., 2004). Atua como ligante de hemoglobina, agente bacteriostático e fator estimulador de angiogênese, participa do metabolismo de lipídios e possui um importante efeito imunomodulador. A Cp atua como transportadora do cobre, essencial para a eritropoiese, com efeito antioxidante nas células e tecidos, a fim de protegê-los de compostos gerados pela fagocitose de micro-organismos e de debris de tecidos e redução de neutrófilos anexados ao endotélio (CERÓN et al., 2005).

Dentre as imunoglobulinas, detectou-se, no traçado eletroforético, IgG e IgA. A IgG relaciona-se estreitamente com a eliminação de agentes bacterianos por meio da opsonização e fagocitose. Assim sendo, em infecções sistêmicas, a resposta imune humoral caracteriza-se por altos títulos de

IgG (CERÓN et al., 2005). Adicionalmente, tem-se que a IgA, em animais domésticos, atua como anticorpo secretório dentro do trato intestinal e dos pulmões, sendo capaz de neutralizar vírus e prevenir aderências de patógenos bacterianos aos tecidos-alvo. Presente nas secreções respiratórias, gastrintestinais, genitourinárias, lágrima e saliva, a IgA é importante para defesa local e proteção das superfícies corporais contra invasões bacterianas e virais (JAIN, 1993).

CONCLUSÃO

O proteinograma obtido em gel de poliacrilamida possibilitou a detecção de até 26 proteínas no traçado eletroforético do líquido sinovial de cavalos hígidos, podendo trazer contribuição significativa ao diagnóstico, tratamento e prognóstico de animais com alterações articulares.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^a Labtest (Sistema de Diagnósticos Ltda. - Lagoa Santa, Brasil).

^b Labquest (CELM, modelo E-225-D).

^c Fotodyne, (Fotodyne Inc, Houston, TX, USA).

^d Marcador (Sigma Marker 6.500 – 200.000).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Protocolo nº 140-11.

REFERÊNCIAS

- CARAPETO, M.V. et al. Serum α -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal Equine Veterinary Science**, v.26, p.120-127, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080606000451>>. Acesso em: 23 ago. 2013. doi:10.1016/j.jevs.2006.01.007.
- CERÓN, J.J. et al. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902658>>. Acesso em: 23 ago. 2013. doi:10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x.
- CLYNE, M.J. Pathogenesis of degenerative joint disease. **Equine Veterinary Journal**, v.19, n.1, p.15-18, 1987. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.1987.19.issue-1/issuetoc>>. Acesso em: 23 ago.2013. doi: 10.1111/j.2042-3306.1987.tb02569.
- DI FILIPPO, P.A. et al. Perfil eletroforético das proteínas séricas e do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.938-946, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/9699/8373>>. Acesso em: 23 ago. 2013. doi: 10.5216/cab.v11i4.9699.
- DI FILIPPO, P.A. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, 1-glicoproteína ácida, transferrina e I-antitripsina, em equinos com cólica. **Ciência Rural**, v.41, n.12, p.2108-2113, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782011001200012&script=sci_arttext>. Acesso em: 23 ago. 2013. doi:10.1590/S0103-84782011001200012.
- HONNAS, C.M. et al. Septic tenosynovitis in horses: 25 cases (1983- 1989). **Journal American Veterinary Medical Association**, v.199, p.1616-1622, 1991. Disponível em: <http://works.bepress.com/james_schumacher/33/>. Acesso em: 23 ago. 2013.
- JACOBSEN, S. et al. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.110, n.3-4, p.325-330, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242705003144>>. Acesso em: 23 ago. 2013. doi:10.1016/j.vetimm.2005.10.012.
- JAIN, N.C. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. In: JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Saunders, 1993. p.349-380.
- JAIN, S. et al. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.3, p.118-127, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3053509/>>. Acesso em: 26 ago. 2013. doi: 10.4103/0975-7406.76489.
- MAHAFFEY, E.A. Synovial fluid. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. (Eds.). **Cytology and hematology of the horse**. Goleta: American Veterinary, 1992. p.153-161.
- MOORE, D.F. et al. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: Interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. **Inflammation**, v.21, n.1, p.69-82, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179623>>. Acesso em: 23 ago. 2013. doi: 10.1023/A:1027342909423.
- MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/tvj>. Acesso em: 23 ago.2013. doi:10.1016/S1090-0233(03)00119-9.
- SAS Institute. **User's guide: statistics**. Version 6.12. Cary: 1995. 60p.
- STASHAK, T.S. **Adam's lameness in horses**. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2002. 341p.
- TIZARD, I.R. **Veterinary immunology: an introduction**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p.147.
- TROTTER, G.W.; McILWRAITH, C.W. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: McILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. Cap.8, p.120-145.