

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA SINOVIAL EN CABALLOS ADULTOS Y POTROS CON PATOLOGÍA ARTICULAR

Memoria presentada por: Thaïs Ribera Townsend

Para optar al Grado de Doctor en Veterinaria

Barcelona, Octubre 2012

Directora de tesis: Marta Prades Robles



Universitat Autònoma de Barcelona

Marta Prades Robles, Professora Titular del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la tesi doctoral que porta per títol: **ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA SINOVIAL EN CABALLOS ADULTOS Y POTROS CON ENFERMEDAD ARTICULAR**, de la que n'és autora la llicenciada en Veterinària **Thaïs Ribera Townsend**, s'ha realitzat a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la meva direcció.

I per a què així consti, a efectes de ser presentada coma a treball de Tesi Doctoral per a optar al Grau de Doctor en Veterinària, signo aquest certificat a Bellaterra, 11 d' octubre de 2012.

Marta Prades Robles

“La ciencia sirve para darnos una idea de cuán vasta es nuestra ignorancia”

Robert De Lamennais

AGRADECIMIENTOS

- Agradecimientos -

AGRADECIMIENTOS

A todos los que han colaborado en este proyecto común.

En especial a mis dos directores de tesis, Marta Prades y Lluís Monreal. Ellos tuvieron la idea de iniciar este proyecto y confiaron en mi dándome esta oportunidad nada más empezar mi residencia en Cirugía equina en el 2006. A Lluís, por su apoyo, paciencia, dedicación, persistencia, y su capacidad para contagiarme el entusiasmo y la disciplina. A Marta, por su apoyo incondicional, positivismo y su *open-minded character* que han recompensado todo el esfuerzo y trabajo tanto de la residencia como del doctorado. También agradecerle por concederme la gran oportunidad de ser su residente y permitir que se cumpliera mi sueño profesional. Sin ellos dos todo esto no hubiera sido posible.

Quiero agradecer a toda la gente que ha pasado y sigue estando en la Fundación Hospital Clínico Veterinario, a la gente de la Universidad Autónoma de Barcelona, a los veterinarios referentes y a las empresas que de una manera u otra han puesto su granito de arena. Como no quiero dejarme a nadie y sabéis que siempre voy al grano con mi "pim-pam", quiero expresar mi agradecimiento de forma muy especial a TODOS los compañeros que han formado parte de la Unidad Equina desde que empecé la residencia, y a todos los que han colaborado directa o indirectamente en este estudio. Como no sois poca gente los que habéis contribuido en mi formación durante este periodo, tanto de forma profesional como personal, prefiero no nombrar sólo a unos cuantos para después ofender a muchos.

Tampoco encuentro las palabras para expresar mi agradecimiento a mi familia *i a la meva parella* por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia, porque aunque no lo parezca, tengo mucha tela.... Sin ellos no hubiera llegado nunca donde estoy.
MIL GRACIAS.

Por último, quisiera dedicar este trabajo a Lluís Monreal, que ha sido tan director de tesis como Marta Prades y que tras su fallecimiento y por motivos burocráticos no puede aparecer su nombre en la contraportada como se merece. "Lluís....allà va!"

Un abrazo a todos.

Thaïs

AGRAÏMENT PÒSTUM

In memoriam

Dr. Lluís Monreal Bosch

- Agraïment pòstum -

ABREVIACIONES

- Abreviaciones -

ABREVIACIONES

AS	Artritis séptica
COMP	Proteína de la matriz oligomérica cartilaginosa
FDP	Productos de degradación de fibrina/fibrinógeno
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
OA	Osteoartritis
OCD	Osteocondritis disecante
PA	Activador de plasminógeno
PAI-1	Inhibidor de plasminógeno
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PIA	Presión intra-articular
MMP	Metaloproteinasas de matriz
PA	Activadores de plasminógeno
PT	Concentración de proteínas totales
RA	Artritis reumatoide humana
RTCB	Recuento total de células blancas
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TAFI	Inhibidor de fibrinolisis activado por trombina
TAT	Complejo trombina-antitrombina
TF	Factor tisular
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TNF- α	Factor de necrosis tisular- α
u-PA	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa

ÍNDICE

- Índice -

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y características fisiológicas generales de la articulación	23
1.1. Cápsula y ligamentos peri-articulares	24
1.2. Membrana sinovial	24
1.3. Líquido sinovial	26
1.4. Inervación articular	27
1.5. Cartílago articular	27
1.6. Hueso subcondral.....	29
2. Fisiopatología de la articulación y su respuesta frente a una lesión	29
2.1. Principios generales de patología articular	29
2.2. Cascada de coagulación y fibrinólisis articular	31
2.2.1. Cascada de coagulación sinovial.....	32
2.2.2. Fibrinólisis sinovial	33
2.2.3. Dímero-D sinovial.....	35
3. Patología articular en caballos	36
3.1. Relevancia clínica	36
3.2. Patologías articulares más comunes en el caballo.....	37
3.2.1. Osteoartritis	37
3.2.2. Osteocondritis disecante	37
3.2.3. Artritis séptica	38
4. Análisis del líquido sinovial	38
5. Relevancia clínica del dímero-D	39

HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS.....	47
ESTUDIOS.....	51
ESTUDIO # 1. " Synovial fluid D-dimer concentration in foals with septic joint disease"	55
ESTUDIO # 2. " Synovial fluid D-dimer concentration in horses with osteochondritis dissecans and osteoarthritis"	63
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES.....	83
RESUMEN.....	87
SUMMARY	91
REFERENCIAS	95



INTRODUCCIÓN

La fisiopatología articular en el caballo es extremadamente compleja y comporta una serie de procesos biopatológicos que, si no se detectan y tratan a tiempo, generan un ciclo catabólico autodestructivo que induce la degradación de los propios tejidos articulares¹.

En pacientes humanos se ha demostrado que en la patogénesis articular también intervienen otros mecanismos relacionados como la activación de la fibrinólisis y la cascada de la coagulación, que desempeñan su papel en la fisiopatología y homeostasis articular².

Hay muy poco descrito sobre los procesos fisiopatológicos relacionados con la coagulación intra-articular en la bibliografía equina³ y la mayoría son extrapolaciones de medicina humana. Este proyecto documenta la actividad fibrinolítica sinovial de caballos con patologías articulares como la osteocondritis disecante (OCD), la osteoartritis (OA) y la artritis séptica (AS), mediante la determinación de la concentración de dímero-D en el líquido sinovial.

1. ANATOMÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS GENERALES DE LA ARTICULACIÓN

La patología articular se basa en la disfunción de uno o varios de todos los componentes de la articulación y para el entendimiento de la patología articular es necesario recordar la anatomía y las características fisiológicas básicas de cada uno de estos componentes.

¹McIlwraith CW. General pathobiology of the joint and response to injury. In: Joint Disease in the Horse. McIlwraith CW, Trotter GW (eds). Philadelphia: WB Saunders 1996; 40-70.

²So AK, Varisco PA, Kemkes-Matthes B, et al. Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. J Thromb Haemost 2003; 1:2510-2515.

³Bertone AL. Infectious Arthritis. In: Joint Disease in the Horse. McIlwraith CW, Trotter GW, (eds). Philadelphia: WB Saunders 1996; 397-409.

Las articulaciones móviles (diartrosis) están formadas por una **cápsula articular** y dos o más **ligamentos peri-articulares**, la **membrana sinovial**, el **líquido sinovial** que ésta produce, el **cartílago articular** y el **hueso subcondral** subyacente.

1.1. Cápsula y ligamentos peri-articulares

La **cápsula** fibrosa y los **ligamentos peri-articulares** encierran externamente la superficie articular y están compuestos principalmente por colágeno tipo I (75%), proteoglicanos (23%) y algunas fibras de elastina. Sus fibras discurren en fascículos paralelos junto con vasos sanguíneos y nervios, y éstas se convierten en fibrocartílago y cartílago calcificado antes de insertarse en el hueso⁴. Éstas son metabólicamente activas por lo que se hipertrofian con la actividad y se atrofian con la inmovilización⁵. La cápsula está internamente tapizada por una membrana sinovial.

1.2. Membrana sinovial

La **membrana sinovial** está vascularizada e inervada y es la encargada de producir el líquido sinovial con el que contacta directamente y participa en la defensa y la respuesta inmunitaria intra-articulares. Está compuesta por una fina capa de tejido conectivo (subíntima o lámina propia) y por una fina capa de uno a cuatro estratos de sinoviocitos (íntima o sinovia).

⁴Mankin HJ, Radin E. Structure and function of joints. In: Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology (Second ed). McCarty DJ (ed). Philadelphia: Lea & Febiger 1993; 181-210.

⁵Thornton GM, Shrive NG, Frank CB. Healing ligaments have decreased cyclic modulus compared to normal ligaments and immobilization further compromises healing ligament response to cyclic loading. J Orthop Res 2003; 21:716-722.

La membrana sinovial tiene propiedades secretoras (producción de hialuronano, colágeno, lubricina, pro-metaloproteinasas de la matriz (pro-MMP), interleucinas y eicosanoides como la prostaglandina E₂)^{1,6}, que cumplen funciones de mantenimiento de la propia membrana sinovial, confieren características especiales al líquido sinovial como el mantenimiento de la viscosidad y las propiedades tixotrópicas, y propiedades fagocíticas responsables de producir el líquido sinovial y de eliminar los desechos y las partículas intra-articulares.

La vascularización de la membrana sinovial llega a través una red de arteriolas procedentes de las arterias epifisarias, ubicadas en la unión del periostio con la membrana formando un círculo perimetral. Las arteriolas más gruesas penetran en el hueso y nutren parte de la epífisis y el hueso subcondral, hasta la capa profunda del cartílago calcificado. Las arteriolas más pequeñas permanecen en la periferia del cartílago, configurando la circulación pericondral. A su vez, la membrana sinovial posee una amplia red capilar que se prolonga emitiendo una arteriola central a lo largo de cada vellosidad. Las vellosidades son una zona muy importante para el intercambio de sustancias y para la producción de hialuronano⁷. La proximidad de los capilares a la superficie sinovial (5-10 µm) y la ausencia de membrana basal facilitan el intercambio de solutos a través de la membrana sinovial.

La circulación en la membrana sinovial puede verse afectada por la presión intra-articular (PIA), la temperatura local, la movilidad articular, los reflejos, el tono vasomotor y la liberación local de mediadores vasoactivos⁸⁻¹⁰.

⁶Todhunter RJ. Anatomy and physiology of synovial joints. In Joint Disease in the Horse. McIlwraith CW, Trotter GW, (eds). Philadelphia: WB Saunders 1996; 1-28.

⁷Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Local hemodynamics, permeability and oxygen metabolism of innervated or denervated isolated equine joints. Am J Vet Res 1998; 59(10): 307-1316.

⁸Bertone AL. Joint Physiology: responses to exercise and training. In Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor JR (eds): Equine Sports Medicine and Surgery. Saunders Elsevier 2004; 152-160.

En condiciones normales existe un intercambio de fluido entre el plasma y el líquido sinovial. El endotelio evita que las moléculas grandes abandonen los capilares sinoviales. La “barrera de permeabilidad” sinovial hacia las moléculas pequeñas se mantiene gracias al estrecho espacio entre los sinoviocitos y por la composición de la matriz extracelular. Las moléculas de ácido hialurónico también actúan como barrera para el intercambio de moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas de menos de 10kDa normalmente se equilibran entre el plasma y el líquido sinovial y generalmente cruzan la sinovia por difusión simple. Las moléculas de glucosa circulan más rápido que otras moléculas debido a un mecanismo de difusión facilitada, y moléculas lipofílicas como el oxígeno y el dióxido de carbono difunden fácilmente hacia dentro y fuera del líquido sinovial tanto a través de los sinoviocitos como entre el intersticio.

1.3. Líquido sinovial

El **líquido sinovial** es un ultrafiltrado del plasma que conserva la mayoría de los iones y moléculas del plasma, excepto el hialuronano que es producido en altas concentraciones por los sinoviocitos B. Todos sus componentes están regulados por la membrana sinovial.

El líquido sinovial tiene como funciones principales lubricar y nutrir el cartílago, regular la presión y temperatura articular, y participar en la defensa y la respuesta inmunitaria intra-articulares.

⁹Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Joint pressure influences synovial blood flow as determined by colored microspheres. *J Appl Physiol* 1996; 80:1225-1232.

¹⁰Richman AI, Su EY, Ho G. Reciprocal relationship of synovial fluid volume and oxygen tension. *Arthritis Rheum* 1981; 24:701-705.

El líquido sinovial contiene células mononucleares (sinoviocitos macrofágicos y fibroblásticos, monocitos y linfocitos), que constituyen el 90% del total de células, y el resto son leucocitos polimorfonucleares. En general, una muestra de líquido sinovial normal no contiene un recuento total de células blancas (RTCB) de más de 500 células/ μ l y presenta una concentración de proteínas totales (PT) inferiores a 2.5 g/dl. Su aspecto normal es amarillo pajizo transparente y viscoso, pero estas características varían en circunstancias patológicas.

1.4. Inervación articular

La **inervación** articular proviene de ramas independientes de nervios periféricos y de nervios provenientes de los músculos asociados. Las fibras nerviosas se distribuyen en la cápsula fibrosa y en los ligamentos articulares asociados y penetran junto a los vasos sanguíneos y linfáticos hasta el tejido sinovial de forma similar a la vascularización descrita.

1.5. Cartílago articular

El **cartílago articular** constituye la superficie articular y, juntamente con el líquido sinovial, posibilita que el movimiento articular se realice con una fricción mínima. El cartílago carece de vascularización, inervación y de drenaje linfático, por lo que para el aporte de nutrientes y la eliminación de sustancias de desecho depende del mecanismo de difusión de los solutos a través de la membrana sinovial hasta el líquido sinovial

donde, a través de la matriz extracelular del cartílago, llegan hasta el condrocito, y viceversa¹¹. La superficie del cartílago presenta poros de un diámetro aproximado de 6 nm que permiten el paso de algunos solutos (iones, glucosa, etc).

Su apariencia translúcida (hialina) se debe a su alto contenido en agua (70-80%) y al tipo y fina estructuración de las fibras de colágeno tipo II. El cartílago equino contiene aproximadamente un 50% de colágeno, 35% de proteoglicanos, 10% de glucoproteínas (proteinasas y sus inhibidores, factores de crecimiento, lisozimas, fibronectina, condronectina, proteína de la matriz oligomérica cartilaginosa (COMP), etc), entre un 1-12% (del volumen total de cartílago) de condrocitos, 3% de minerales, un 1% de lípidos y un 1% de otras sustancias⁶.

Las cargas soportadas actúan como estímulos mecánicos, osmótico-iónicos y eléctricos y pueden afectar la homeostasis celular¹². Los condrocitos responden ante una amplia variedad de estímulos intracelulares y extracelulares, que incluyen la concentración de H⁺, el volumen, la presión, la osmolaridad, la concentración de Ca²⁺, factores de crecimiento y citoquinas que pueden condicionar muchas funciones celulares, incluyendo la síntesis y degradación de la matriz¹³. Los condrocitos responden ante los distintos niveles de carga de tal forma que un grado de carga mecánica insuficiente o excesiva favorece los procesos catabólicos¹⁴, mientras que los niveles fisiológicos normales favorecen los procesos anabólicos.

¹¹Frisbie DD. Synovial joint biology and pathobiology. In: Equine surgery (Fourth ed). Auer JA, Stick JA (eds). St Louis: Elsevier Saunders 2012; 1096-1114.

¹²Kim YJ, Sah RLY, Grodzinsky AJ, et al. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. Arch Biochem Biophys. 1994; 311:1-12.

¹³Wilkins RJ, Fairfax TP, Davies ME, et al. Homeostasis of intracellular Ca²⁺ in equine chondrocytes: response to hypotonic shock. Equine Vet J. 2003; 35(5):439-443.

¹⁴Skiöldebrand E, Heinegard D, Olofsson B, et al. Altered homeostasis of extracellular matrix proteins in joints of standardbred trotters during a long-term training programme. J Vet Med. 2006; 53:445-449.

1.6. Hueso subcondral

El **hueso subcondral** comprende el tejido subarticular mineralizado que se extiende desde la unión entre el cartílago calcificado y el no calcificado (frente de mineralización) hasta el inicio de la médula ósea. Sus funciones principales consisten en dar soporte al cartílago articular suprayacente, distribuir la carga mecánica a la diáfisis cortical subyacente, así como absorber la tensión de los impactos mecánicos continuos y nutrir las capas profundas del cartílago hialino. El hueso subcondral experimenta remodelaciones en respuesta al ejercicio¹⁵, pero un aumento excesivo del remodelado óseo subcondral (esclerosis subcondral) conduce a un deterioro de la matriz extracelular cartilaginosa y consecuente degeneración articular¹.

Cuando se altera la estructura, función o relación entre uno o varios de estos componentes articulares se inicia un proceso fisiopatológico cuya finalidad última es restablecer la homeostasis articular.

2. FISIOPATOLOGÍA GENERAL DE LA ARTICULACIÓN Y SU RESPUESTA FRENTE A UNA LESIÓN

2.1. Principios generales de patología articular

En el caballo hay multitud de patologías articulares (artritis) descritas y cada una tiene su fisiopatología específica. En este proyecto hemos incluido 3 grandes grupos de

¹⁵Kawcak CE, McIlwraith CW, Norrdin RW, et al. Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints in horses. Am J Vet Res 2000; 61:1252-1258.

patología articular que se clasifican por su distinta etiología: artritis traumática, de desarrollo (osteocondrosis (OC)), e infecciosa (séptica).

Todas estas patologías articulares tienen una patogénesis similar pero su localización y grado de respuesta inflamatoria son algo diferentes. El resultado final, si el problema no se controla y el proceso de reparación anabólico se ve superado por el proceso catabólico, es la enfermedad degenerativa articular que causa pérdida de rendimiento y cojera en el caballo, y por tanto implica importantes pérdidas económicas en el mundo deportivo ecuestre¹⁶.

La mayoría de patologías articulares implican mayor o menor grado de **sinovitis** (inflamación de la sinovia). Ésta puede ser primaria, por consecuencia directa de un traumatismo agudo o repetitivo como el inducido por el ejercicio, o secundaria a otro proceso concomitante como la osteocondritis disecante (OCD) en la que tanto los fragmentos osteocondrales como el cartílago o hueso dañados liberan detritus y mediadores que provocan inflamación de la membrana sinovial¹. Así mismo, la presencia de fragmentos osteocondrales y los defectos producidos tras desprenderse provocan inflamación mecánica directa en la cavidad articular, erosión del cartílago e inestabilidad articular provocada por el incremento de líquido sinovial y por la presencia de los fragmentos que crean incongruencia de las superficies articulares.

La **inflamación** de la membrana sinovial puede afectar a la difusión y regulación de células inflamatorias y mediadores periféricos. En otros casos puede afectar directamente el metabolismo del sinoviocito, que una vez dañado, libera enzimas

¹⁶USDA. National economic cost of equine lameness, colic, and equine protozoal myeloencephalitis in the United States. USDA:APHIS:VS, National Health Monitoring System. Information sheet. Fort Collins (CO): October, 2001. #N348.1001.

catabólicas (IL-1 y TNF- α) de sus lisosomas¹⁷. Adicionalmente, la presencia de partículas de desecho del cartílago aumenta la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), citoquinas catabólicas y metaloproteinasas (colagenasa, estromelina y gelatinasa), que además de generar un ciclo catabólico perpetuo que induce la degradación de los tejidos articulares y sinovitis, involucran otros mecanismos como la **cascada de coagulación**^{1,18}.

2.2. Cascada de coagulación y fibrinólisis articular

En pacientes humanos, la comunicación molecular entre la cascada de coagulación y la de la inflamación está ampliamente reconocida tanto en enfermedades articulares inflamatorias como degenerativas³. Dicha actividad se ha determinado midiendo las actividades tanto del factor tisular (TF) como del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), y los niveles antigénicos del complejo trombina-antitrombina (TAT), **dímeros – D de fibrina**, inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (TAFI) y de fragmento de trombina.

Desde 1962 está establecida la asociación entre la degradación del cartílago y la activación o presencia de componentes de la cascada de coagulación como la plasmina^{19,20}.

¹⁷Weissman G. Lysosomes in joint disease. *Arthritis Rheum* 1966; 10:834-840.

¹⁸Loyau G, Pujol JP. The role of cytokines in the development of osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1990; 81:8-12

¹⁹Curtiss PH, Jr, Klein L. Destruction of articular cartilage in septic arthritis: I. In vitro studies. *J Bone Joint Surg Am* 1963; 45-A:797-806.

²⁰Lack ACH, Anderson AJ, Les Y, et al. Action of plasmin on cartilage matrix in vivo. *Nature* 1961; 191:1402-1403.

2.2.1. Cascada de coagulación sinovial

Las citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-6) se liberan cuando existe un daño articular y células intra-articulares como los fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos inducen la expresión del **TF**. El TF que es una glucoproteína integral de la membrana celular de la mayoría de células intra-articulares y es el pro-inflamatorio más importante responsable de mediar la cascada de coagulación induciendo la activación de la trombina intra-articular^{7, 21}.

El TF se une al factor VIIa de la vía extrínseca. El complejo creado cataliza la activación del factor X (Xa), que es en el que convergen las dos vías de la coagulación, extrínseca e intrínseca. El factor Xa es parte del complejo protrombinasa y cataliza la conversión de la protrombina en trombina. Finalmente, el fibrinógeno plasmático, que es extravasado fácilmente hacia el interior de la articulación a través de los vasos congestivos de la membrana sinovial inflamada, será convertido mediante la acción de la trombina en fibrina soluble (monómero inestable)²¹.

La fibrina soluble (inestable) se genera a partir de la acción de la **trombina** sobre el fibrinógeno. La trombina también activa el factor XIII que en presencia de calcio entrelaza la fibrina soluble hasta producir un entramado de fibrina tridimensional insoluble (estable). Véase la Figura 1.

Si esta fibrina estable no es degradada mediante algún otro mecanismo articular, el depósito de fibrina perpetuará la respuesta inflamatoria en la articulación provocando cambios degenerativos permanentes^{1, 21}.

²¹Busso N, Hamilton JA. Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2268-2279.

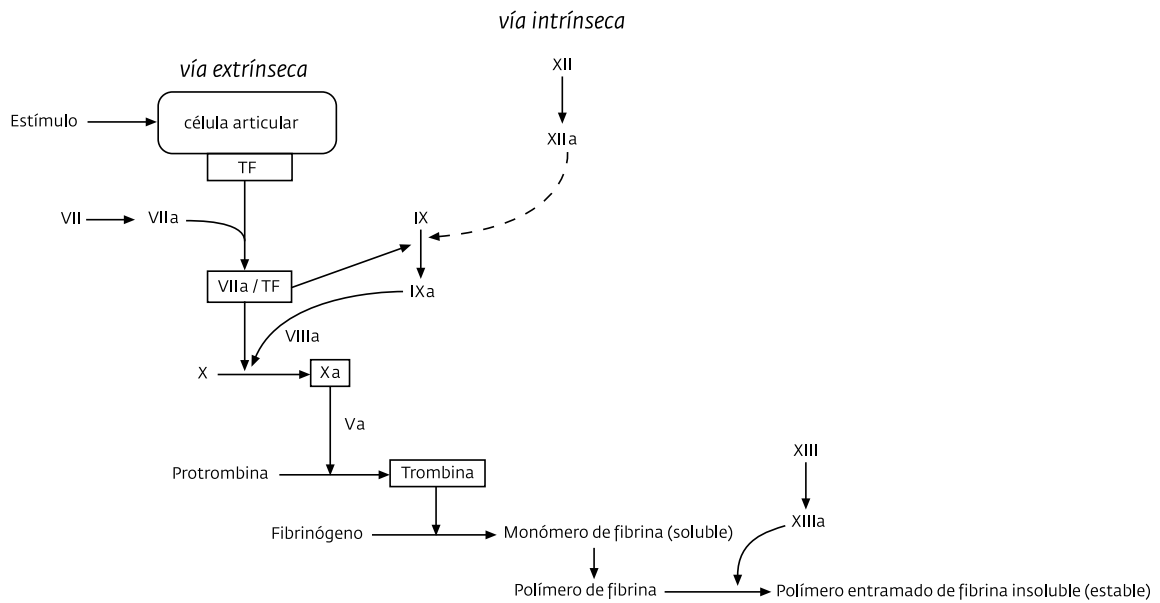


Figura 1. Representación esquemática de la formación del entramado fibrina insoluble (estable) en la articulación. Esquema adaptado de "Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis". Busso N, Hamilton JA. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2268-2279.

2.2.2. Fibrinólisis sinovial

Paralelamente, para compensar la balanza, se inicia un proceso de fibrinólisis sinovial en el que los macrófagos, sinoviocitos, condrocitos y células polimorfonucleares intra-articulares, activados por la inflamación, producen 2 tipos de activadores de plasminógeno (PA) (serin proteinasas): tisular (t-PA) y uroquinasa (uPA), que son los principales activadores fibrinolíticos²¹, especialmente el primero. Éstos catalizan el plasminógeno, que está presente en cantidades significativas en la matriz del cartílago, en plasmina, la cual degradará la fibrina entrelazada en productos de degradación de la fibrina (FDP) entre los que hayamos los dímeros-D^{2,21, 22}.

²²Barnhart MI, Riddle JM, Bluhm GB, et al. Fibrin promotion and lysis in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 1967; 26: 206-218.

El t-PA es una enzima débil en ausencia de fibrina. En presencia de fibrina estimula significativamente, aproximadamente 1.000 veces, la activación del plasminógeno que se une al fibrinógeno y a la fibrina soluble e induce un cambio de conformación de la enzima y el sustrato. Esta unión favorece la formación local de plasmina y la degradación *in situ*²³ de la fibrina.

La plasmina, mediada por la estimulación de la IL-1, también activa las colagenasas latentes¹⁸. A su vez, la IL-1 y el TNF- α , estimulan la liberación del inhibidor de plasminógeno (PAI-1)²⁴ que contribuye a la reducción de la actividad fibrinolítica articular reduciendo la producción de t-PA. Esto provoca un desequilibrio entre la inhibición y la activación fibrinolítica de la articulación.

La actividad fibrinolítica sinovial es esencial para degradar la fibrina que se genera tras una lesión o inflamación moderada o severa de la articulación. Cuando existe un desequilibrio marcado entre la formación excesiva de fibrina y una insuficiente actividad fibrinolítica, la articulación permite el depósito de fibrina la cual se organiza para formar adherencias sinoviales permanentes¹. Entonces se comienzan a perpetuar las reacciones inflamatorias que contribuyen al daño articular crónico y degenerativo^{1,22}.

La actividad fibrinolítica puede medirse mediante la determinación de diferentes biomarcadores, pero la determinación del dímero-D parece el test más específico²⁵.

²³Hoylaerts M, Rijken DC, Lijen HR, et al. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem*, 1982; 257:2912-2919.

²⁴Whawell SA, Thompson JN. Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells. *Eur J Surg* 1995; 161:315-317.

²⁵Stokol T, Erb HN, De Wilde L, et al. Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrin(ogen) degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic. *Vet Clin Pathol* 2005; 34:375-382.

2.2.3. Dímero-D sinovial

El dímero-D es un producto específico de la fibrinólisis que resulta sólo de la degradación de la fibrina estable y su presencia es indicativa de la formación previa de un coágulo. La determinación de dímero-D en estudios previos ha demostrado ser sensible y útil para diagnosticar estados de hipercoagulación en caballos con cólico^{26,27} y potros septicémicos²⁸, y para determinar la actividad fibrinolítica en el líquido peritoneal de caballos con cólico²⁹.

Tanto en procesos patológicos como fisiológicos la plasmina rompe el fibrinógeno y la fibrina soluble dando lugar a los productos de degradación de fibrina/fibrinógeno (FDP), incluyendo los fragmentos X,Y,D, y E. En procesos patológicos, para evitar la formación de adherencias, la plasmina también rompe la fibrina entrelazada insoluble, formando unos fragmentos grandes llamados X-oligómeros que varían en peso molecular. La continuación de la degradación de la plasmina sobre estos fragmentos grandes produce el producto de degradación más pequeño que es el fragmento E, que está unido de forma no covalente a 2 fragmentos D (**dímero-D**)³⁰.

La ventaja de determinar dímero-D en lugar de FDP es que los nuevos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los epítomos de dímero-D en los X-oligómeros (fragmentos grandes que resultan sólo de la degradación de la fibrina estable) por lo que no existen reacciones cruzadas con el fibrinógeno ni con los productos de degradación de la fibrina inestable³¹. Sin embargo, estas reacciones sí

²⁶Monreal L. D-dimer as a new test for the diagnosis of DIC and thromboembolic disease. *J Vet Intern Med* 2003; 17:757-759.

²⁷Cesarini L, Monreal L, Armengou L, et al. Association of Admission Plasma D-Dimer Concentration with Diagnosis and Outcome in Horses with Colic. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1490-1497.

²⁸Armengou L, Monreal L, Tarancón I, et al. Plasma D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med* 2008; 22:411-417.

²⁹Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal fibrinolytic activity in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2009; 23:882-889.

³⁰Francis CW, Marder VJ. A molecular model of plasmic degradation of crosslinked fibrin. *Semin Thromb Hemost* 1982; 8:25-35.

³¹Kroneman H, Nieuwenhuizen W, Knot EAR. Monoclonal antibody-based plasma assays for fibrin(ogen) and derivatives, and their clinical relevance. *Blood Coagul Fibrinol* 1990; 1:91-111.

ocurren con los ensayos que utilizan anticuerpos policlonales y monoclonales utilizados para detectar los FDP tradicionales.

Un aumento en la concentración sinovial de dímero-D está, por lo tanto, fuertemente relacionado con el aumento de la destrucción de fibrina estable (hiperfibrinolisis) secundario al aumento en la formación de fibrina (hiperfibrinogénesis).

En humanos se ha demostrado, mediante la determinación de dímero-D, la actividad fibrinolítica en el líquido sinovial de pacientes artríticos, y dicha actividad se ha comparado entre las diferentes patologías articulares².

3. PATOLOGÍA ARTICULAR EN CABALLOS

3.1. Relevancia clínica

La cojera es el problema médico más importante en el caballo³² y, puesto que limita su rendimiento deportivo, tiene una repercusión económica importante, especialmente en la industria de caballos atléticos. Algunas fuentes estiman una prevalencia de caballos cojos del 8,5 hasta el 13,7% anual¹⁶, que ha ido bajando a lo largo de las últimas décadas gracias a la mejora en la capacidad de diagnóstico, tratamiento y profilaxis. Aún así, sigue siendo motivo de investigación científica e inversión económica, especialmente lo que refiere a patología articular. Hay estudios que apuntan que el 60% de las cojeras están relacionadas con la osteoartritis equina³³ y ésta es actualmente un modelo extrapolable para la investigación clínica y terapéutica humana³⁴.

³²USDA. Lameness and laminitis in U.S Horses. USDA: APHIS:VS, CEAH. National Animal Health Monitoring System. Fort Collins (CO): 2000. #N318.0400.

³³Caron JP, Genovese RL. Principles and practices of joint disease treatment. In: Diagnosis and Management of Lameness in the horse. Ross MW, Dyson SJ (eds): Philadelphia, WB Saunders Company 2003; 746-64.

3.2. Patologías articulares más comunes en el caballo

Hemos mencionado anteriormente que en el caballo podemos dividir la etiología de la patología articular en 3 grandes grupos: traumática, de desarrollo (osteocondrosis), e infecciosa (séptica). La OA y la OCD en caballos adultos y la AS en potros neonatos son las artritis más comunes que se diagnostican en la práctica veterinaria equina.

3.2.1. Osteoarthritis

La osteoartritis es el resultado de la degeneración y pérdida progresiva y permanente del cartílago articular, inducidas por un trauma agudo o un trauma repetitivo crónico como el ocasionado por el ejercicio. La fisiopatología de la OA no tiene una acción eminentemente inflamatoria, pero sí que intervienen factores inflamatorios que desempeñan un papel patogénico importante¹. También se han descrito alteraciones genéticas que afectan la estructura y la función de la molécula de colágeno tipo II del cartílago que la hacen biomecánicamente imperfecta y que acaban provocando una OA heredable³⁵.

3.2.2. Osteocondritis disecante

La osteocondrosis (OC) es el fracaso en la osificación endocondral. Cuando las lesiones se extienden a la superficie articular causando una respuesta inflamatoria en la

³⁴Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther.* 2002; Jan 9(1):12-20.

³⁵Eyre DR, Weis MA, Moskowitz RW. Cartilage expression of a type II collagen mutation in an inherited form of osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia 1991; 87:357-361.

articulación nos referimos a ella como osteochondritis³⁶, y si existen fragmentos osteocondrales libres en la articulación entonces la definimos como **osteochondritis disecante**³⁷. OCD es por tanto una manifestación clínica de OC. El término "osteochondritis" indica inflamación del hueso y del cartílago y "disecante" proviene del latín "dissecans" que significa que "se separa" de la superficie articular.

3.2.3. Artritis séptica

La **artritis séptica** se define como la reacción inflamatoria aguda incitada por la inoculación de bacterias en la membrana sinovial o en el líquido sinovial que permite el establecimiento de organismos viables³. Es común en potros septicémicos menores de 30 días. Esta patología articular en los caballos es la que tiene el componente inflamatorio más importante, basado en el análisis del líquido sinovial y es comparable a la artritis reumatoide humana (RA), en la que el depósito de fibrina tras la activación de la cascada de coagulación tiene efectos pro-inflamatorios en la articulación^{2,3,21}. Dicha patología puede resultar en enfermedad degenerativa articular si no se diagnostica y trata a tiempo.

4. ANÁLISIS DEL LÍQUIDO SINOVIAL

El RTCB, la PT y el diferencial de células, especialmente el porcentaje de neutrófilos, son actualmente los parámetros más útiles en la clínica equina para diagnosticar o diferenciar entre un proceso articular infeccioso o inflamatorio, aunque recientemente se

³⁶McIlwraith CW. What is the developmental orthopedic disease, osteochondrosis, osteochondritis, metabolic bone disease? Proc Am Assoc Equine Practnr 1993; 39:35-44.

³⁷Barrie HJ. Osteochondritis dissecans 1887-1987: A centennial look at König's memorable phrase. J Bone Joint Surg Br 1987; 69B(5):693-695.

han descrito otros biomarcadores que también podrían ser útiles³⁸. Otros biomarcadores detectados en el líquido sinovial o en el suero como las metaloproteinasas de matriz (MMP), la COMP, el keratan sulfato y el condroitin sulfato, han sido utilizados para determinar el grado de lesión ósea o del cartílago^{39,40} con el fin de diagnosticar de forma temprana una patología articular degenerativa. Sin embargo, tienen el inconveniente de que no son métodos de diagnóstico rápidos ni económicos, lo que limita su uso clínico en la clínica.

5. RELEVANCIA CLÍNICA DEL DÍMERO-D

El dímero-D es un marcador específico de la actividad fibrinolítica y se ha demostrado que es un test sensible y útil para detectar estados de hipercoagulación tanto en humanos como en algunas especies animales incluida el caballo^{26-28,41,42}.

La determinación de la concentración local de dímero-D también se ha utilizado para valorar la actividad fibrinolítica en diferentes fluidos corporales humanos^{2,43}, en perros^{44,45} y en caballos²⁹. Sin embargo, la concentración sinovial de dímero-D sólo se

³⁸Wauters J, Martens A, Pille F, et al. Equine myeloperoxidase: a novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infection; EVJ 2012 (IN PRESS).

³⁹McIlwraith CW. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. Equine Vet J 2005; 37:473-482.

⁴⁰Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. Osteoarthritis Cart 2008; 16:1196-1204.

⁴¹Monreal L, Anglés A, Espada Y, et al. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. Equine Vet J Suppl 2000 32:19-25.

⁴²Cesarini C, Monreal L, Segura D, et al. Hemostatic follow up of horses with medical and surgical colic. J Vet Intern Med 2009; 23:434 (abstract).

⁴³Philip-Joët F, Alessi MC, Philip-Joët C, et al. Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions. Eur Respir J 1995; 8(8):1352-6.

⁴⁴Escanilla N, Leiva M, Peña MT, et al. Aqueous humor fibrinolytic activity in dogs with cataracts. Veterinary Ophthalmology 2012. (ACCEPTED).

ha estudiado en pacientes humanos con diferentes tipos de artritis² y en animales de experimentación^{46,47}. En humanos se ha observado que la activación de la cascada de coagulación y de fibrinólisis articular ocurre tanto en artritis inflamatorias (reumatoide) como en artritis degenerativas (osteoartritis), y son las artritis inflamatorias las que muestran el aumento más marcado en la concentración sinovial de dímero-D².

Se han utilizado otros marcadores hemostáticos alternativos al dímero-D para valorar estados de hipercoagulación plasmáticos: productos de degradación de la fibrina, concentración de plasminógeno, actividad de proteína C, t-PA y PAI-1 y complejos trombina-antitrombina (TAT), pero tienen algunos inconvenientes. Algunos son para uso exclusivo en estudios de investigación y son demasiado caros para su uso en medicina equina (t-Pa, PAI-1 y complejos TAT), y otros han demostrado ser poco específicos (proteína C y plasminógeno). PAI-1 y t-PA son buenos marcadores para determinar la actividad fibrinolítica, pero no están disponibles para la clínica diaria.

Productos de la actividad fibrinolítica como los FDP y el dímero-D son también marcadores de fibrinólisis y consecuentemente de activación de la coagulación. El primero no es específico de la degradación de fibrina por lo que tiene un bajo valor predictivo en la clínica equina. En cambio, el dímero-D es el producto final de la degradación de fibrina estable mediada por la plasmina y la determinación de su concentración es un buen marcador de la actividad fibrinolítica.

⁴⁵ De la Fuente C, Monreal L, Añor S, et al. Fibrinolytic Activity in Cerebrospinal Fluid of Dogs with Different Neurological Disorders. *J Vet Intern Med* 2012; (IN PRESS).

⁴⁶ Busso N, Péclat V, Van Ness K, et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102:41-50.

⁴⁷ Van Ness K, Chobaz-Péclat V, Castellucci M, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 deficiency attenuates murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology* 2002; 41:136-141.

Estudios humanos han demostrado, mediante la determinación de la concentración de dímero-D y otros marcadores hemostáticos, que en la articulación artrítica existe una activación generalizada tanto de la fibrinólisis como de la cascada de la coagulación, y que están relacionadas con la inflamación. Los procesos involucrados son comunes en todas las artritis estudiadas aunque son más prominentes en la artritis reumatoide, lo que explicaría el depósito de fibrina intra-articular en este tipo de patología articular².

Sin embargo, no conocemos ninguna otra publicación en la que se haya estudiado mediante la determinación de dímero-D si existe una activación de la cascada de coagulación y de la fibrinólisis en la articulación de especies animales, y concretamente del caballo. Hasta el momento, los procesos fisiopatológicos relacionados con la coagulación intra-articular que hay descritos en la bibliografía equina³ son extrapolaciones de medicina humana.



HIPÓTESIS

- Hipótesis -

HIPÓTESIS

1. La actividad fibrinolítica sinovial en caballos, evaluada mediante la determinación de la concentración de dímero-D, aumenta con la existencia de patología articular.
 - a. La concentración de dímero-D sinovial de caballos con OCD o con OA es mayor que la de caballos sin patología articular.
 - b. La concentración de dímero-D sinovial de potros con AS es mucho mayor que la de potros sin patología articular.
2. La concentración de dímero-D del líquido sinovial de la articulación afectada no se ve alterada por la presencia de enfermedad sistémica en el caballo.



OBJETIVOS

- Objetivos -

OBJETIVOS

1. Determinar la activación fibrinolítica sinovial de caballos con patología articular, mediante la determinación de la concentración de dímero-D sinovial de la articulación afectada.
 - a. Determinar la activación fibrinolítica sinovial de caballos adultos con OA o con OCD, mediante la determinación de la concentración de dímero-D en el líquido sinovial de la articulación afectada.
 - b. Determinar la activación fibrinolítica sinovial de potros con AS, mediante la determinación de la concentración de dímero-D del líquido sinovial de la articulación infectada.
2. Valorar si la determinación de la concentración sinovial de dímero-D puede ser útil como marcador de patología articular.



ESTUDIOS PUBLICADOS

ESTUDIOS

Para cumplir con los objetivos de esta tesis diseñamos y llevamos a cabo los siguientes estudios:

Estudio # 1: T. Ribera, L. Monreal, L. Armengou, J. Ríos, and M. Prades. **Synovial Fluid D-Dimer Concentration in Foals with Septic Joint Disease.** Journal of Veterinary Internal Medicine 2011; 25:1113–1117.

Estudio # 2: T. Ribera, L. Monreal, M. A. Delgado, J. Ríos and M. Prades. **Synovial fluid D-dimer concentration in horses with osteochondritis dissecans and osteoarthritis.** Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology. Vet Comp Orthop Traumatol 2013; 26: ••–•• doi:10.3415/VCOT-11-08-0110.

ESTUDIO #1

**Synovial Fluid D-Dimer Concentration
in Foals with Septic Joint Disease**

- Estudios -

Synovial Fluid D-Dimer Concentration in Foals with Septic Joint Disease

T. Ribera, L. Monreal, L. Armengou, J. Ríos, and M. Prades

Background: Increased synovial fibrinolytic activity (detected by increases in synovial D-Dimer concentrations) has been observed in different joint diseases in humans and adult horses, presumably in order to minimize fibrin deposition within the joint and thus avoid its detrimental effects.

Objective: To investigate fibrinolytic pathway activation in joint sepsis in foals by measuring synovial D-Dimer concentrations.

Animals: Eighteen septic foals with septic joints, 9 septic foals without septic joints, 9 systemically healthy foals with septic joint, and 3 controls are included.

Methods: Prospective observational clinical study of foals admitted for septic arthritis. Synovial D-Dimer concentration and routine synovial fluid analysis were performed. Diagnosis of joint sepsis was made whenever synovial total nucleated cell count was $>30,000$ cells/ μ L, synovial total protein >4 g/dL, and neutrophil percentage of $>80\%$, or synovial fluid culture resulted positive. Results were compared among groups by general linear models.

Results: Synovial D-Dimer concentration was significantly ($P < .001$) higher in the foals with septic joints compared with foals without joint disease ($P < .001$).

Conclusions and Clinical Importance: Septic joint disease is associated with a marked increase of synovial D-Dimer concentration (marked activation of the fibrinolytic activity) within the affected joint. Although further studies are needed, the measurement of synovial D-Dimer concentration may be considered a complementary diagnostic marker of septic joint disease.

Key words: Equine foals; Septic arthritis; Septicemia; Synovial fibrinolysis.

Septic arthritis and especially septic polyarthritis in septicemic foals^{1,2} are disease entities that can result in degenerative joint disease³ and decrease the likelihood of athletic performance.⁴ A retrospective study involving Thoroughbred foals showed that the diagnosis of septic arthritis reduced racing starts.⁴ Early detection and treatment of joint sepsis might improve the prognosis in these sick foals. Synovial fluid total nucleated cell count (TNCC), total protein concentration (TP), and cell differential are the most useful parameters in making the diagnosis of septic arthritis.⁵ Occasionally, it might be difficult to differentiate an early stage of infective arthritis with a relatively low TNCC from a traumatic arthritis with a high white cell count⁶ or from animals that have been treated with antibiotics and may have a negative

Abbreviations:

CF	control foals
FSJ	systemically healthy foals with a septic joint
OA	osteoarthritis
OCD	osteocondritis dissecans
SF	septicemic foals without septic joints
SFSJ	septic foals with septic joints
TNCC	total nucleated cell count
TP	total protein concentration

result on culture. In these cases having a synovial biomarker test that is affordable and quick could be useful in the decisions for therapy. Use of biomarkers focused on diagnosing infectious joint diseases has been reported.^{7–10}

Concurrent activation of synovial fibrinolytic and coagulation pathways has been detected as a result of joint inflammation in human arthritic patients and especially so in rheumatoid arthritis patients.¹¹ Activation of the fibrinolytic pathway is considered a protective, homeostatic response in inflamed joints. In degenerative joint diseases such as osteoarthritis (OA), the activation of both pathways is also apparent in humans¹¹ and it has been recently observed in horses affected by *osteocondritis dissecans* (OCD) and OA.¹²

D-Dimer concentration measurement is a sensitive marker for systemic and local (ie, peritoneal fluid) fibrinolytic activity.^{13,14} Hence, any increase of the synovial fluid D-Dimer concentration is considered strongly related to the activation of the synovial fibrinolytic activity in affected joints.¹⁵ The main purpose of this study was to assess synovial fibrinolytic activity of foals with septic arthritis by the determination of synovial D-Dimer concentrations. Our hypotheses were that (1)

From the Servei de Cirurgia Equina (Ribera, Prades) and Servei de Medicina Interna Equina (Monreal, Armengou), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and the Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Statistics & Methodology Support Unit, ID-IBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain (Ríos). Preliminary results from this study were presented at the 9th Congress of the European Veterinary Emergency and Critical Care Society (EVECCS), in Cambridge, UK, June 2010. The manuscript represents a portion of a thesis submitted by the first author at the Universitat Autònoma de Barcelona as partial fulfilment of the requirements for her PhD program, supervised by the last authors.

Corresponding author: Thaïs Ribera, DVM, Servei de Cirurgia Equina, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain; e-mail: thaïs.ribera@uab.cat

Submitted October 8, 2010; Revised April 18, 2011; Accepted June 1, 2011.

Copyright © 2011 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2011.0758.x

the synovial D-Dimer concentration is markedly and significantly higher in foals with septic arthritis than in those foals without joint disease and (2) this increase of synovial D-Dimer concentration in septic joints is not affected by the presence of systemic disease.

Materials and Methods

In this prospective observational clinical study, foals admitted to the Unitat Equina-Fundació Hospital Clínic Veterinari between October 2006 and September of 2009 were distributed into 4 groups as follows: (1) septic foals with septic joints (SFSJ), (2) septic foals without septic joints (SF), (3) systemically healthy foals with a septic joint (FSJ), and (4) control foals (CF).

The diagnosis of septic joint disease was reached when any one of the following findings was present: (a) the synovial TNCC was $>30,000$ cells/ μ L, synovial TP >4 g/dL, and neutrophil percentage of $>80\%$ in the synovial cytology,¹⁶ (b) presence of microorganisms in the synovial cytological examination, or (c) a positive synovial fluid culture. Diagnosis of septicemia was confirmed when any of the following findings were present: a positive blood culture, sepsis score ≥ 11 ,¹⁷ septic polyarthritis, and/or post-mortem findings consistent with a septicemic foal. The diagnosis of septic polyarthritis was confirmed when at least 2 joints were determined to be septic.

Three healthy foals that were admitted to the hospital for orthopedic problems unrelated to joint disease and that were subsequently euthanized because of financial restraints or a poor athletic prognosis were also included in the study as controls.

Synovial Fluid Collection and Analysis

Synovial fluid samples were aseptically collected from joints either (1) during initial foal examination before any form of treatment or (2) immediately after euthanasia. Samples were placed in 1-mL tubes containing EDTA for a routine synovial fluid analysis (color, clarity, mucin clot formation, TNCC, TP, and cytology evaluation) under the supervision of a boarded clinical pathologist. An automated blood cell counter^a was used for TNCC determination in synovial fluid, and TP was measured by refractometry. Cytospin^b preparations and Diff-Quick staining were used for the microscopic evaluation^c of synovial fluid cytologies. Samples collected after hours were immediately analyzed on site by a semiautomatic cell counter,^d and kept refrigerated at 4°C for later submission to the laboratory for cytologic examination.

Synovial D-Dimer Concentration (ng/mL)

Synovial fluid samples (1 mL) were placed in 1 mL tubes containing sodium citrate (3.8%) (1:9, citrate: synovial fluid). Within the first 2 hours after collection, samples were centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 minutes and supernatants were pipetted and stored at -70°C for further analysis. Synovial D-Dimer concentration was measured in duplicate, by a quantitative immuno-turbidimetric latex agglutination assay^e with commercial reagents and controls,^f according to the manufacturer's instructions. The upper and lower limits of detection of the assay are 5,000 and 0 ng/mL, respectively. Samples higher than 5,000 ng/mL were diluted 1:4 with saline solution^g as many times as necessary. Results obtained were multiplied by the dilution factor. This assay has been previously validated and employed by our group in different samples of equine origin.^{13,14,18–20a,g}

Statistical Analysis

Quantitative results for principal variables (synovial D-Dimer concentration, TNCC, and TP) and age were expressed as a median

and interquartile range (25th–75th percentile). For the statistical assessment of sepsis, as data did not follow a normal distribution, a nonparametric approach, by means of rank-transformation, was used with a general linear model (GLM) with a posthoc analysis for evaluation of differences between disease groups. In the case of qualitative variables (sex or survival foals), the description was based on absolute frequencies and percentages.

A two-tailed type-I error of 0.05 was used in all statistical inference. Results were considered to be significant when $P < .05$. Commercial software (SPSS for Windows, version 15.0)^h was used for the statistical analysis.

Results

Animals Included in the Study

Thirty-nine foals were included in the study: 18 septic foals with septic joints, 9 septic foals without septic joints, 9 FSJ, and 3 controls.

Sex, Breed, and Age. Twenty of 39 foals were males and 19 were females. Breed distribution was as follows: Andalusians (24), Arabians (6), crossbreds (3), ponies (2), Westfalian (1), Quarterhorse (1), standardbred (1), and warmblood (1). The distribution of ages by diagnosis was as follows: 6 days (3–14 days) for the SFSJ; 0.5 days (0.5–4 days) for the SF, 25 days (22–34 days) for the FSJ, and 76.5 days (15–138.7 days) for the CF.

SFSJ

All of these 18 septic foals with septic polyarthritis had heat and synovial fluid effusion in at least 2 joints (range 2–7 joints). Six of these foals had mild to severe lameness, and the remaining 12 foals were nonambulatory or too weak to be able to appreciate lameness.

Other diagnoses, together with the septic polyarthritis related to septicemia, in this group of foals included pneumonia (6), enteritis (5), omphalitis with or without patent urachus (5), and failure of transfer of passive immunity (5).

Seven blood cultures were positive: *Escherichia coli* (3), *Klebsiella* spp. (2), *Pasteurella* spp. (1), *Pseudomonas putida* (1); 5 were negative and in the remaining 6 foals blood culture was not performed as they had received antibiotics before admission.

Five synovial fluid cultures resulted positive: *E. coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Bacteroides fragilis* (1), *Salmonella* spp. (1), *Pasteurella* spp. (1), and 3 resulted negative.

Septic Foals without Septic Joints (SF)

None of the SF presented clinical evidence of joint disease. Results of the standard synovial fluid analysis from the samples collected (synovial TNCC and TP) were all within normal ranges (<500 – $1,000$ nucleated cells/L and <2.5 g/dL, respectively). Synovial samples from these foals were collected immediately after euthanasia, except for 2 foals where joint involvement was initially suspected but was later ruled out. The sepsis score was ≥ 11 in all of them. Major diagnoses confirmed other than septicemia were failure of transfer of passive immunity (4), immaturity (3), and hypoxic-ischemic encephalopathy (2).

FSJ

All 9 foals showed marked to severe lameness (range 3–5/5) and synovial effusion in all affected joints. The cause of the septic arthritis was confirmed to be traumatic in only 1 foal attributable to a puncture wound. Their sepsis scores on admission were always <10. Clinical examinations were normal, except for the presence of lameness and distension of affected joints.

None of the 6 blood cultures performed resulted positive.

Three out of 6 synovial cultures resulted positive (*E. coli* [2] and *Klebsiella* spp. [1]).

CF

The 3 foals that were included as controls were referred for open fetlock luxation, tibial fracture, and pastern fracture, respectively. Their clinical examinations were normal, except for the main orthopedic problem, and their postmortem examination confirmed no joint abnormalities or presence of other systemic disease.

Excluded Foals. Eleven other foals were excluded from the study because their final diagnoses were consistent with nonseptic inflammatory joint disease (such as OCD, chip fracture, and *Rhodococcus equi* immunomediated polyarthritis) and did not meet the inclusion criteria of our study.

Outcome. Fifteen out of 36 foals (42%) survived and the remaining 21 foals (58%) did not. Seven of the 15 survivors were FSJ (47%), 6 were SFSJ (40%), and 2 were SF (13%). Twelve of the 21 nonsurviving foals were SFSJ (57%), 7 were SF (33%), and 2 were FSJ (9%).

Synovial Fluid Samples Included in the Study. A total of 65 synovial fluid samples were analyzed: 42 septic synovial fluid samples from the SFSJ, 10 nonseptic synovial fluid samples from the SF, 9 septic synovial fluid samples from the FSJ, and 4 normal synovial fluid samples from the CF.

Foals included in the study grouped by diagnosis, number of synovial fluid samples collected, bilateral or unilateral collection, and specific joint sampled are shown in Table 1.

Standard Synovial Fluid Analysis

Synovial TNCC and TP were both significantly higher in the SFSJ and FSJ compared with the SF and with the

CF ($P < .001$). Total proteins were also significantly higher in the SF compared with the CF ($P = .006$) (Table 2).

Synovial D-Dimer Concentration (ng/mL). The synovial D-Dimer concentration in SFSJ and FSJ was significantly ($P < .001$) higher when compared with the SF and to the CF (Fig 1).

The GLM models showed that septicemia did not influence synovial D-Dimer concentration of the affected foals.

Control and nonseptic synovial samples required dilutions between 1:4 and 1:16. Septic synovial samples, however, required at least 1:64 or 1:256 dilutions. Exceptionally, a few dilutions 1:1,024 were required in severely infected joints.

Discussion

The results of this study confirm that septic joint disease in foals is associated with a strong activation of the synovial fibrinolytic pathway based on the markedly and significantly higher synovial D-Dimer concentrations found in synovial fluid of septic joints when compared with those measured in noninfected joints of either septic or healthy foals.

This activation of the fibrinolytic pathway seen in synovial fluid from foals with septic arthritis is much more significant than what has been previously reported in adult horses with different nonseptic arthritis^a and similar or even higher than the synovial D-Dimer values of human inflammatory arthritides.¹¹ A study with human arthritic patients showed that plasmatic and synovial D-Dimers were significantly higher in inflammatory arthritides than in OA ($76,287 \pm 16,360$ ng/mL, synovial data) and that the synovial levels were highest in rheumatoid arthritis patients ($407,006 \pm 46,610$ ng/mL).¹¹ The study concluded that activation of the coagulation and fibrinolytic cascades was evident in both inflammatory and degenerative joint diseases. In the equine study^a results showed that synovial D-Dimer concentration of horses with OCD ($25,172 (8,472-73,472)$ ng/mL) and OA ($21,440 (6,641-50,092)$ ng/mL) were both higher compared with controls ($12,858 (5,794-17,780)$ ng/mL) but were only significantly different in horses with OCD. Plasma D-Dimer values were not evaluated. Because the highest synovial D-Dimer concentrations in

Table 1. Results of the number of foals, number of synovial fluid samples collected, bilateral or unilateral collection, and specific joint sampled of the foals in the study: septic foals with septic joints (SFSJ), septic foals without septic joints (SF), systemically healthy foals with a septic joint (SJJ), and control foals (CF).

Diagnosis	Number of Foals	Number of Synovial Fluid Samples	Sample Collection (Number of Foals)	Sampled Joints
SFSJ	18	42	Unilateral (24) Bilateral (9)	11 TC, 3 MC, 2 RC, 4 MCP, 1 FT, 2 FP, 1 elbow 10 TC, 6 MC, 2 RC
SF	9	10	Unilateral (8) Bilateral (1)	6 RC, 2 TC 1 TC
FSJ	9	9	Unilateral (9)	4 TC, 2 FP, 1 MC, 1 RC, 1 FT
CF	3	4	Unilateral (2) Bilateral (1)	2 RC 1 MC

FP = femoropatellar joint; FT = femorotibial joint; MC = middle carpal joint; MCP = metacarpophalangeal joint; TC = tarsocrural joint; RC = radiocarpal joint.

Table 2. Data regarding the principal variables of interest: synovial total nucleated cell count (TNCC), total protein (TP) and D-dimer concentration, grouped by septic foals with septic joints (SFSJ), septic foals without septic joints (SF), systemically healthy foals with a septic joint (FSJ), and control foals (CF).

	Synovial Fluid TNCC (cells/ μ L)	Synovial Fluid TP (g/dL)	Synovial Fluid D-Dimer Concentration (ng/mL)
SFSJ	13,600 (4,450–60,400)*	3.5 (2.5–4.1)	299,104 (122,112–687,232)*
SF	500 (450–850)	1.80 (0.9–2.2) ^{&}	40,640 (19,232–95,512)
FSJ	14,025 (8,500–50,200)*	3.4 (3.2–4.0)	400,384 (256,768–632,064)*
CF	600 (500–800)	0.85 (0.8–1.4) [§]	36,753 (30,096–45,041)

Values given are expressed in (median, interquartile range). Analyses were performed by means GLM models with non-parametric approach.

*Significantly different from SF and CF ($P < .001$).

[§]Significantly different from SFSJ and FSJ ($P < .001$) and from SF ($P = .006$).

[&]Significantly different from SFSJ and FSJ ($P < .001$) and from CF ($P = .006$).

both human¹¹ and equine patients (foals and adults^a) have been observed in the arthritides with the strongest inflammatory component: rheumatoid arthritis, septic arthritis, and OCD, respectively, the most likely cause for such increased activation of the coagulation and fibrinolytic pathways is related to the severity of the inflammation.

Baseline D-Dimer concentrations of normal foals could be slightly more increased than in adult horses but a larger population is needed to confirm this. Additionally, as the range of age in our foal population was small enough between the different groups, a statistical analysis adjusted by the foals' age was considered unnecessary.

Plasma overspill of D-Dimer concentration into the joints of very sick foals was ruled out because synovial D-Dimer concentration in septic foals without septic joint disease was much lower than the concentration

observed in SFSJ and therefore increased synovial D-Dimer concentration should only be attributed to local joint inflammation and not to systemic disease. Furthermore, the synovial D-Dimer concentration in septic joints was much higher (approximately from 100 to 150-fold higher) than concentrations previously reported from the plasma of very sick foals,^{18,19} or even from samples with blood contamination.¹⁴

The fact that septicemia was not diagnosed in the FSJ does not rule out bacterial hematogenous seeding as the initial cause of the single septic arthritis in these foals, especially when considering that joint infection is the most common consequence to bacteremia in newborn foals and that penetrating articular wounds rarely occur in these animals (< 60 days).¹

Regarding standard synovial fluid variables (TNCC and TP), these were significantly higher compared with

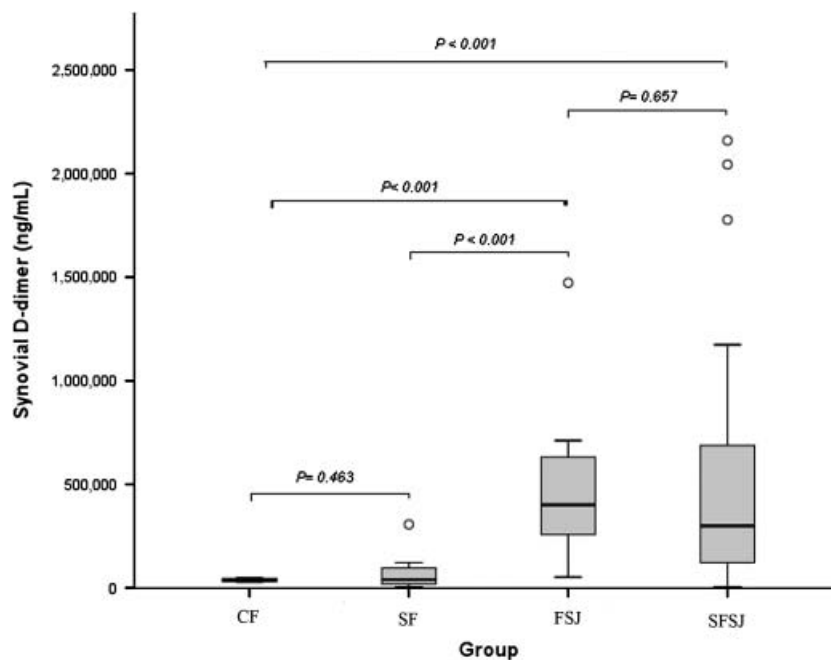


Fig 1. Box-plots of synovial D-Dimer concentrations from the controls (CF), septic foals without septic joints (SF), systemically healthy foals with a septic joint (FSJ), and septic foals with septic joints (SFSJ), respectively. Central boxes represent the values from the lower to upper quartile (25–75 percentile), while the middle line represents the median. Significant differences are shown by their specific P values.

the nonseptic joint groups (SF and CF), as expected. Septicemic foals without joint disease, however, also showed significantly higher total proteins compared with the controls, but these differences were not relevant as the total protein values in both groups were within normal ranges (<2.5 g/dL).

A limiting factor in this study is that the group of CFs is small. However, considering that plasma overflow of D-Dimers from systemically sick patients leads to imperceptible changes in the synovial D-Dimer concentration, septicemic neonates without septic joint diseases can be considered similar to controls, although we are aware that a larger population of controls would be highly recommended.

Because the foal population in the present study is small, it does not allow the establishment of a synovial D-Dimer cut-off concentration to diagnose joint infection, although it is evident that an extremely increased synovial D-Dimer concentration is highly suggestive of septic joint disease. Further clinical trials need to be performed to be able to determine this cut-off value.

In conclusion, synovial D-Dimer concentration is extremely high in foals with septic joints, which shows that the inflammatory response attributable to infection produces a strong activation of fibrinolytic activity in the affected joints. Although further studies are warranted, the measurement of synovial D-Dimer concentration may prove in the future to be an additional marker of septic joint disease. The test is quick, easy, patient-side, and affordable in clinical practice.

Footnotes

^a Advia 120 Analyzer, Bayer Lab, New York, NY

^b Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge, GMI Inc, Ramsey, MN

^c Microscopy Hemacolor, Merck Eggen, Darmstadt, Germany

^d Vet ABC Diff Hematology Analyzer, Heska, Fort Collins, CO

^e Miniquant, Biopool, Trinity Biotech, Wicklow, Ireland

^f Miniquant-1, Biopool, Trinity Biotech

^g Cesarini C, Monreal L, Segura D, et al. Hemostatic follow up of horses with medical and surgical colic. *J Vet Intern Med* 2009;23:434 (abstract)

^h SPSS Inc, Chicago, IL

References

- Martens RJ, Auer JA, Carter GK. Equine pediatrics: Septic arthritis and osteomyelitis. *J Am Vet Med Assoc* 1986;188:582–585.
- Brewer BD. Neonatal infection. In: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC, eds. *Equine Clinical Neonatology*. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1990:317–330.
- Steel CM, Hunt AR, Adams PL, et al. Factors associated with prognosis for survival and athletic use in foals with septic arthritis. *J Am Vet Med Assoc* 1999;215:973–977.
- Smith LJ, Marr CM, Payne RJ, et al. What is the likelihood that Thoroughbred foals treated for septic arthritis will race? *Equine Vet J* 2004;36:452–456.
- Bertone AL. Update on infectious arthritis in horses. *Equine Vet Educ* 1999;11:143–152.
- Trotter GW, McIlwraith CW. Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: McIlwraith CW, Trotter GW, eds. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1996:120–145.
- Trumble TN, Trotter GW, Oxford JRT, et al. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J Vet Res* 2001;62:1467–1477.
- Jacobsen S, Niewold TA, Halling-Thomsen M, et al. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;112:321–322.
- Jacobsen S, Thomsen MH, Nanni S. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *Am J Vet Res* 2006;67:1738–1742.
- Fietz S, Bondzio A, Moschos A, et al. Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases – an initial case study. *Res Vet Sci* 2008;84:347–353.
- So AK, Varisco PA, Kemkes-Matthes B, et al. Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *J Thromb Haemost* 2003;1:2510–2515.
- Ribera T, author: Monreal L, Delgado MA, et al. Synovial fibrinolysis activity in horses with inflammatory joint/tendon sheath disease. Annual Congress of the European College of Veterinary Surgery (ECVS), Helsinki, Finland, July 2010.
- Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal fibrinolytic activity in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2009;23:882–889.
- Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. Effects of blood contamination on peritoneal D-dimer concentration in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2009;23:1232–1238.
- Busso N, Hamilton JA. Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2268–2279.
- Bertone AL. Infectious arthritis. In: McIlwraith CW, Trotter GW, eds. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia, PA: Saunders; 1996:397–409.
- Brewer BD, Koterba AM. Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Vet J* 1988;20:18–22.
- Armengou L, Monreal L, Tarancón I, et al. Plasma D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med* 2008;22:411–417.
- Armengou L, Monreal L, Delgado MA, et al. Low-molecular-weight heparin dosage in newborn foals. *J Vet Intern Med* 2010;24:1190–1195.
- Cesarini C, Monreal L, Armengou L, et al. Association of admission plasma D-dimer concentration with diagnosis and outcome in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2010;24:1490–1497.

ESTUDIO # 2

Synovial fluid D-dimer concentration in horses with osteochondritis *dissecans* and osteoarthritis.

Synovial fluid D-dimer concentration in horses with osteochondritis dissecans and osteoarthritis

T. Ribera¹; L. Monreal²; M. A. Delgado²; J. Ríos³; M. Prades¹

¹Servei de Cirurgia Equina, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ²Servei de Medicina Interna Equina, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ³Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, and Statistics & Methodology Support Unit, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Keywords

Synovial fibrinolytic activity, synovial D-dimer concentration, horse, osteochondritis dissecans, osteoarthritis

Summary

Objective: To assess the synovial fibrinolytic pathway activation in adult horses with developmental and degenerative arthropathies such as osteochondritis dissecans (OCD) and osteoarthritis (OA) by measuring synovial D-dimer concentrations.

Methods: Prospective observational clinical study of horses admitted for OCD or OA. Synovial fluid was collected during lameness examination or before surgical procedure,

and D-dimer concentration and routine synovial fluid analysis were performed.

Results: Fifty-eight horses (14 with OCD, 10 with OA and 34 controls) were included in this study. Synovial D-dimer concentrations of horses with OCD and OA were both higher compared with controls but were only significantly different in horses with OCD ($p = 0.005$). However, no statistical differences were observed when comparing synovial D-dimer concentrations from the OCD horses versus the OA-affected horses ($p = 0.444$).

Clinical significance: Activation of coagulation and fibrinolysis play a role in the pathophysiology of equine OCD and OA.

catabolic cycle that induces joint tissue degradation, may involve other related mechanisms such as the coagulation pathway. Inflammatory cytokines induce the expression of local tissue factor, a cell membrane-associated cofactor of most intra-articular cells that mediates the coagulation pathway within the affected joint (6). Consequently, plasma fibrinogen is extravasated into the synovial cavity through the hyper-permeable inflamed synovial microvasculature whereby it clots into fibrin within the affected joint (7). Concurrently, synovial fibrinolysis is initiated and the activated intra-articular cells (macrophages, synoviocytes, chondrocytes and polymorphonuclear cells) produce tissue plasminogen activators and urokinase plasminogen activators, which are the main fibrinolytic activators within the joint that convert plasminogen into plasmin, which in turn degrades fibrin into synovial fibrin degradation products such as D-dimer (6, 7, 8). In contrast, when fibrin deposition exceeds degradation, the inflammatory reactions within the synovial cavity perpetuate and contribute to permanent joint damage (chronic inflammatory disorders, degenerative lesions, synovial adhesions) (Figure 1)(9, 10).

Molecular crosstalk between the coagulation and inflammation pathways has been recognized in human patients, and activation of coagulation and fibrinolysis cascades in the joint has been observed in both inflammatory and degenerative joint diseases (6). This is particularly evident in arthritides with a strong inflammatory character, such as rheumatoid arthritis

Correspondence to:

Thaïs Ribera, DVM
Servei de Cirurgia Equina
Departament de Medicina i Cirurgia Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona
08193-Bellaterra, Barcelona
Spain
Phone: +34 581 13 87
Fax: +34 93 581 34 28
E-mail: Thaïs.Ribera@uab.cat

Vet Comp Orthop Traumatol 2013; 26: ●●--●●
doi:10.3415/Vcot-11-08-0110

Received: August 5, 2011
Accepted: September 6, 2012
Pre-published online:

Introduction

Degenerative joint disorders in horses such as osteoarthritis (OA) and developmental diseases affecting joint tissues such as osteochondritis dissecans (OCD) are frequently diagnosed as causes of lameness, which is probably the most common cause of reduced performance and economic loss in the equine industry (1, 2, 3).

Considerable progress is being made in the advancement of knowledge of joint disorders and an increased understanding of all the mechanisms involved in joint disease is important to improve the diagnosis, treatment and prevention of these different arthropathies (4, 5). In a diseased joint, pathobiological processes trigger the secretion of inflammatory cytokines, which apart from generating a self-perpetuating

(RA), where fibrin deposition occurring after intra-articular activation of the coagulation cascade has local pro-inflammatory effects (6, 7). An association between joint disease and synovial fibrinolysis activity in experimental animals has also been observed (11, 12). Finally, a recent study performed by our group shows that septic joint disease in foals is also associated with a very strong activation of the synovial fibrinolysis pathway (13).

To our knowledge, no previous studies have evaluated the activation of coagulation and fibrinolytic pathways in synovial fluid of adult horses with developmental and degenerative arthropathies. Our hypothesis is that synovial fibrinolytic activity, assessed by the measurement of synov-

ial D-dimer concentration, is significantly higher in horses with joint diseases such as OCD and OA than in healthy control horses without joint disease. The main objective of this study was to assess synovial fibrinolytic pathway activation in adult horses with developmental and degenerative arthropathies such as OCD and OA by measuring synovial D-dimer concentrations.

Materials and methods

Horses over one year of age with a history of chronic lameness (with a duration of more than 3 weeks) which were admitted to the Veterinary hospital ((NAME)) be-

tween October 2006 and January 2010, with a diagnosis of either OA or OCD, and from which enough synovial sample volume could be obtained for routine analysis, were included in this prospective observational clinical study. Synovial samples were collected aseptically during lameness examination before local anaesthetic injection or just before arthroscopic surgery.

The diagnosis of OA was based on a positive response to intra-articular anaesthesia and on the presence of at least one radiographic finding consistent with OA, such as subchondral bone sclerosis, marginal osteophyte formation or bone remodelling, together with soft tissue changes such as synovial effusion and capsulitis (9).

The diagnosis of OCD was reached when either one of the following findings was present: **a)** clinical findings together with radiographic changes such as free or semi attached radiodense bodies in the joint with or without joint effusion or lameness; **b)** Arthroscopic visualization of an osteochondral fragment. All horses with OCD or OA were included in the joint disease group and horses with synovial fluid analysis consistent with septic arthritis were excluded.

In addition, 34 crossbred healthy horses (2 years of age) from a slaughter house were used as controls (22 males and 12 females). Prior to slaughter, all horses were examined and observed while walking to ensure that they did not manifest any overt signs of lameness. Immediately after euthanasia, synovial fluid samples were collected from the metacarpophalangeal joints and a radiographic examination was then performed. Finally, joints were opened and examined to confirm the absence of joint damage. Joints were considered normal when all of these parameters were checked to rule out joint disease.

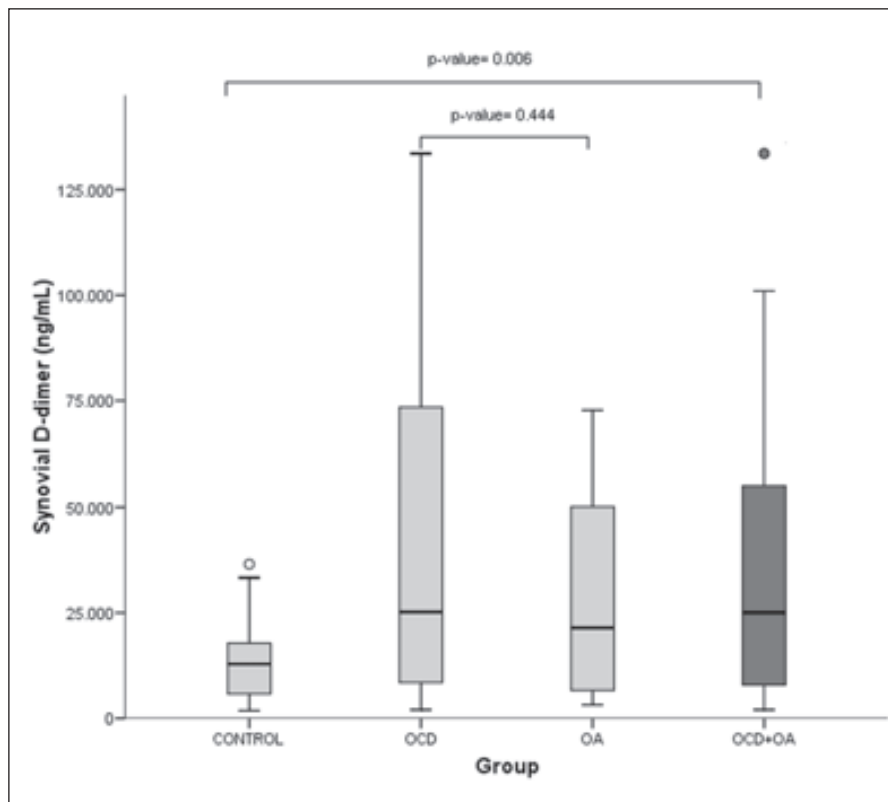


Figure 1 In the damaged joint, pathobiological processes trigger the secretion of inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF α). These induce the expression of local tissue factor, a cell membrane-associated cofactor of most intra-articular cells, which mediates the coagulation pathway within the affected joint. Extravasated plasmatic fibrinogen clots into fibrin within the synovial cavity. Concurrently, synovial fibrinolysis is initiated and the activated intra-articular cells (macrophages, synoviocytes, chondrocytes and polymorphonuclear cells) produce the enzymes – tissue plasminogen activator (t-PA) and urokinase plasminogen activator (uPA) – which are the main fibrinolytic activators within the joint that convert plasminogen into plasmin, which in turn degrades fibrin into synovial fibrin degradation products (FDP) such as D-dimer. In contrast, when fibrin deposition exceeds degradation, the inflammatory reactions within the synovial cavity perpetuate and contribute to permanent joint damage (chronic inflammatory disorders, degenerative lesions, synovial adhesions).

Synovial fluid analysis

Synovial fluid was aseptically collected from joints in both studies. Samples were placed in 1 mL tubes containing EDTA and

^a Advia 120 Analyzer: Bayer Lab, New York, NY, USA

^b Shandon CytoSpin III Cyto centrifuge: GMI Inc., Ramsey, MN, USA

routinely analysed (colour, clarity, mucin clot formation, total nucleated cell count [TNCC], total protein concentration, and cytological evaluation) under supervision of a boarded clinical pathologist. An automated blood cell counter^a was used for synovial TNCC determination, and synovial TP was measured by refractometry. Cytospin preparations^b and Diff-Quick staining were used for microscopic evaluation^c of synovial fluid cytologies. Samples collected after hours were immediately analysed on site using a semiautomatic cell counter^d, and kept refrigerated at 4°C for later submission to the laboratory for cytological evaluation. Septic joint disease was diagnosed when at least two of the following findings were present: **a)** the synovial TNCC was >30,000 cells/μL, **b)** synovial TP was >4 g/dL, and **c)** the percentage of neutrophils was >80% in the synovial cytology (14). Septic synovial samples were excluded from the study.

Synovial D-dimer concentration (ng/mL)

Synovial fluid samples were placed in 1 mL tubes containing sodium citrate (3.8%) (1:9, citrate:synovial fluid). Within the first two hours after collection, samples were centrifuged at 1,000 x g for 10 minutes and supernatants were pipetted and stored at -70°C for further analysis. Synovial D-dimer concentration was measured in duplicate, by a quantitative immunoturbidimetric latex agglutination assay^e with commercial reagents and controls^f, according to the manufacturer's instructions. The upper and lower limits of detection of the assay are 5,000 and 0 ng/mL, respectively. Samples higher than 5,000 ng/mL were diluted 1:4 with saline solution^f as many times as necessary. This assay utilizes human monoclonal antibody coated latex particles that aggregate in the presence of

Table 1 Values of the main variables of interest: synovial total nucleated cell count (TNCC), total protein, and D-dimer concentration in the clinical study according to diagnosis (controls, osteoarthritis [OA]), and osteochondritis dissecans [OCD]).

	Controls (n = 34)	OA (n = 12)	OCD (n = 22)
Synovial D-dimer concentration (ng/mL)	12,858 (5,794 - 17,780)	21,440 (6,641 - 50,092)	25,172* (8,472 - 73,472)
Synovial fluid TNCC (Cells/μL)	800 (700 - 1000)	388* (250 - 700)	256** (165 - 500)
Synovial fluid TP (g/dL)	0.5 (0.3 - 0.6)	1.3** (1 - 2.4)	2.1** (1.1 - 2.4)

Statistical analysis using a non-parametric approach, Mann-Whitney U test. # Values given are expressed at the median (interquartile range).

D-dimer increasing turbidity (quantitative technique) and has been previously used by our group in different samples of equine origin (13, 15-19). Results obtained were multiplied by the dilution factor.

Statistical analysis

Commercial software^g was used for the statistical analysis. Quantitative results for principal variables (synovial D-dimer concentration, TNCC and total protein) are expressed as median and interquartile range (25th and 75th percentiles). As data did not follow a normal distribution, the non-parametric U Mann-Whitney test was used for comparisons among groups for inferential analysis. To evaluate a possible synovial D-dimer cut-off value for use in clinical purposes, a relative operating characteristic curve (ROC) analysis was used combined with an evaluation of the Likelihood Ratio for the positive results assessment (LR+) **defined as sensibility/ (1-specificity) [[AUTHORS: Should this be sensitivity / 1-specificity??]]**. Fisher's exact test was used to determine the synovial D-dimer cut-off value for joint disease, and a logistic regression analysis was performed by means of odds ratio (OR) and its 95% confidence interval for estimation of the increased risk of having joint disease when synovial D-dimer values are high. Positive and negative predictive values were then calculated. In other quantitative

variables (age), the mean and range values were used for descriptive purposes. In case of qualitative variables (gender), the description was based on absolute frequencies and percentages. A two-tailed type I error of 0.05 was used in all statistical inference.

Results

Animals included in the study

In this study, 58 horses were finally included: 24 with joint disease (OCD +OA) and 34 controls. Five patients had been previously excluded because their synovial fluid analysis was consistent with septic arthritis. In the joint disease group, 11 were males, seven geldings and six females. Age ranged from one to 14 years (mean, 5.8 years), and breed representation included: Andalusians (n = 10), Warmbloods (n = 9), Standardbreds (n = 2), Quarterhorse (n = 1), Arabian (n = 1) and crossbred (n = 1).

All 24 horses with joint disease demonstrated a mild to moderate degree of lameness and a mild to severe effusion in the affected joints.

a) OCD group

Fourteen out of 24 horses had a diagnosis of OCD. Age ranged from 1.5 to 14 years (mean, 7.5 years). All OCD-affected joints had loose or semi-attached fragments, as was later confirmed arthroscopically. Synovial fluid samples were taken from eight horses with bilateral OCD (7 horses with

^c Microscopy Hemacolor[®]: Merck Egag, Darmstadt, Germany

^d Vet ABC Diff Hematology Analyzer: Heska, Fort Collins, CO, USA

^e Miniquant, Biopool: Trinity Biotech, Wicklow, Ireland

^f Miniquant-1, Biopool: Trinity Biotech, Wicklow, Ireland

^g SPSS Inc, Chicago, IL, USA

affected **TC** ((AUTHORS: SPELL OUT TC)) joints and one TC plus metacarpophalangeal joint), and from six horses with unilateral OCD (4 TC and 2 femoropatellar joints). Twenty-two synovial fluid samples were finally included in this group.

b) OA group

Ten out of 24 horses had a diagnosis of OA. Age ranged from two to 18 years (mean, 7.5 years). Eight horses had only one joint affected (3 metacarpophalangeal joints, 2 TC and 1 radio-carpal, proximal and distal interphalangeal joint each) and two horses had bilateral disease (1 TC and 1 intercarpal). Twelve synovial samples were finally included in the group.

c) Control group

The control group included 34 horses and 34 synovial fluid samples. In all cases there were not any radiographic signs of abnormalities and no evidence of joint damage was seen on joint dissection. Only one horse was excluded because of radiographic abnormalities, a subchondral cyst, which was later confirmed on joint dissection.

Standard synovial fluid analysis

Median synovial TNCC and **TP** ((AUTHORS: SPELL OUT TP)) values were within normal range in all cases of both OCD and OA horses (20). Median synovial TNCC was significantly lower ($p < 0.001$) in both OCD and OA horses ($p = 0.003$) compared to controls (Table 1), and conversely, synovial TP was significantly higher (p

< 0.001) for the same groups (Table 1), but all values were still within the normal ranges. No differences were seen between the OCD and OA groups.

Synovial D-dimer concentration (ng/mL)

The synovial D-dimer concentration of OCD horses was significantly ($p = 0.005$) higher than the controls. The difference between synovial D-dimer concentration of OA horses and the controls was not significant ($p = 0.154$). However, the differences between synovial D-dimer concentrations of the OCD horses and the OA-affected horses was also not significant ($p = 0.444$). When OCD and OA horses were grouped together in a single 'joint disease' group, synovial D-dimer concentrations were significantly ($p = 0.006$) higher compared to controls (Table 1 and Figure 2).

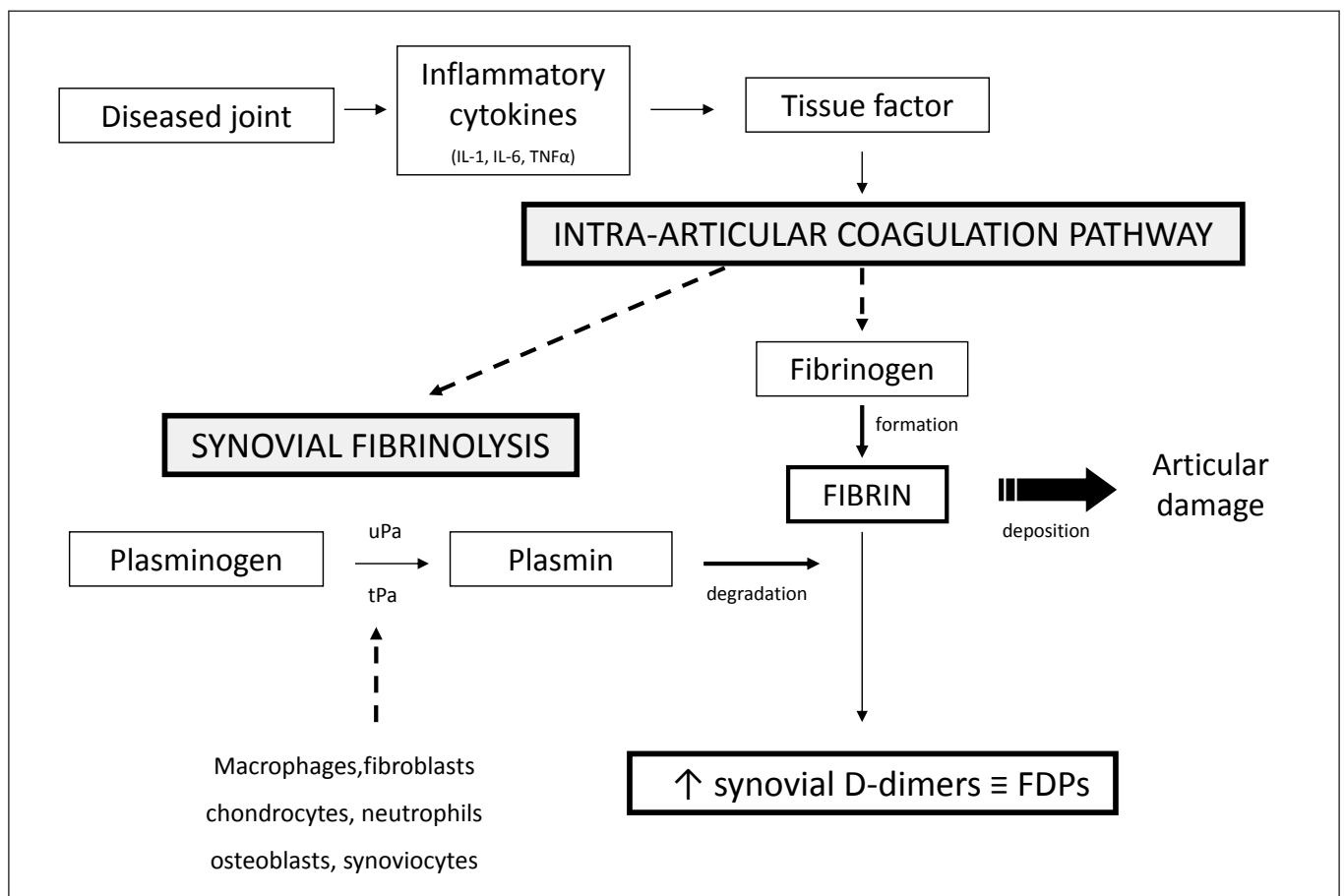


Figure 2 Synovial D-dimer concentration in controls, horses with osteoarthritis (OA), and horses with osteochondritis dissecans (OCD). In dark grey, OA and OCD horses are grouped together for comparison with the control group. Significant differences are shown by their specific p-values.

Control and synovial samples from affected joints required no or between 1:4 and 1:16 dilutions.

Logistic regression study

From the relative operating characteristic curve analysis combined with LR+, the first approach for the synovial D-dimer concentration was determined at 20,000 ng/mL, with a LR+ = 4.5. The logistic regression model then showed that horses with a synovial D-dimer concentration higher than this cut-off value had an odds ratio = 9.8 (95% confidence interval, 2.9 to 33.8) for having a joint disorder. Positive and negative predictive values were 81.8% and 65.2%, respectively.

Discussion

The results of this study show that synovial D-dimer concentration of horses with joint disease (OCD and OA combined) were significantly higher than in the controls. However, when these joint diseases were considered separately, this difference was only significant in horses with OCD. These results agree with the findings of the only study that has been reported of human synovial fluid, which concluded that activation of the coagulation and fibrinolytic cascades was evident in both inflammatory and degenerative joint diseases, including OA (6). However, this study did not have any healthy synovial fluid samples with which to compare.

Even though it is now widely recognized that synovial inflammation is also an important component of OA, the inflammatory response in both human and equine OA is much less prominent than in rheumatoid arthritis (human) or septic arthritis (equine) (21, 22). This difference is clearly reflected when comparing synovial D-dimer concentration values (fibrinolytic activity) of healthy foals with septic arthritis (mean: 400,384; range: 256,768 - 632,064 ng/mL) versus adult horses with non-septic arthropathies: OCD (mean: 25,172; range: 8,472 - 73,472 ng/mL) and OA (mean: 21,440; range: 6,641 - 50,092 ng/mL) (13). These results show that the degree of synovial membrane inflam-

mation may play an important role in contributing to an increased activation of the synovial fibrinolytic activity, which is considered necessary for the resolution of joint inflammation, which support the findings in previous human reports (6-8).

Although synovial D-dimer concentrations obtained in the joint disease groups were higher than in healthy controls, synovial D-dimer values in affected horses had a wide fluctuation. This could be related to age, chronicity, severity of the pathologic process or to the affected joint per se, but the fact that this wide fluctuation was also observed in the control group where all horses were young and had the same age and same joint sampled (MCP), and no signs of joint disease, makes the explication for this variability uncertain (23). Additionally, the fact that control horses were not age-matched with the clinical cases was also a limiting factor. Further prospective clinical studies with a larger horse population and with all these clinical variables controlled are warranted.

A study in humans with rheumatoid arthritis, OA and other joint disorders reported that synovial D-dimer concentrations were at least 10-fold higher than the concentrations in the plasma (6). This

finding was even more striking when comparing synovial D-dimers of septic foals with polyarthritis (299,104 ng/mL [122,112-687,232 ng/mL]) and healthy foals with septic arthritis (400,384 ng/mL [256,768-632,064 ng/mL]) to plasma of very sick foals (702 ng/mL [428.7-2,200.5 ng/mL]) in which synovial concentrations were at least 100 to 150-fold higher than the plasma D-dimer values (13, 15). Similarly to what was described in humans, synovial D-dimer concentrations obtained in adult horses with non-septic joint diseases were also much higher than the reported concentrations that can be reached in plasma of very sick horses (4,925.5, 1,975-8,569.0 ng/mL) (16, 17, 19, 24, 25-27). It seems therefore logical, to consider that the high synovial D-dimer concentration obtained is not associated with plasma to synovial cavity D-dimer overspill and justifies the author's decision to ignore plasma D-dimer concentration of the horses of the present study. None of the synovial fluid samples obtained in the present study were grossly contaminated with blood and furthermore, other studies have demonstrated that even in highly contaminated ($\geq 20\%$ of blood contamination)

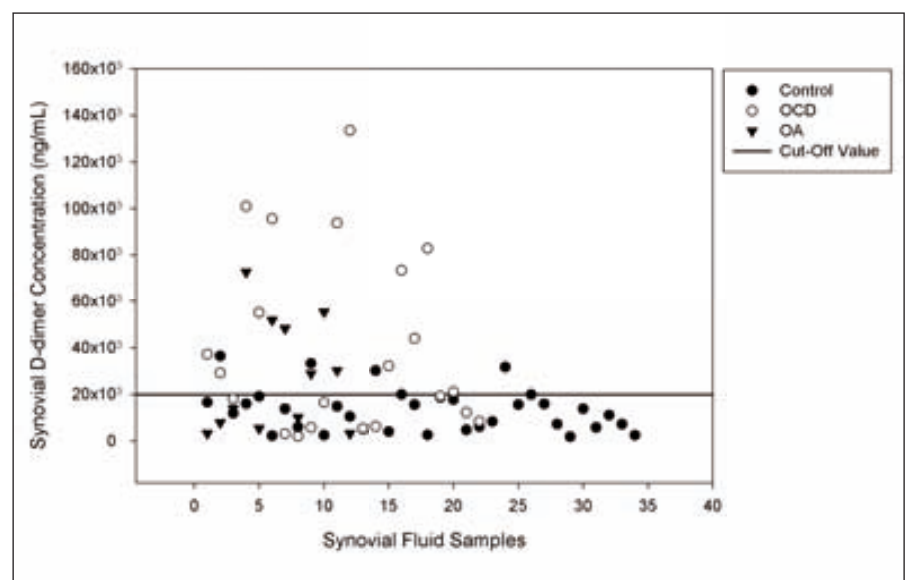


Figure 3 Individual synovial D-dimer concentrations of control, osteochondritis dissecans and osteoarthritis horses. Adult horses with joint disease presented a cut-off synovial D-dimer concentration of 20,000 ng/mL. Horses with a synovial D-dimer concentration above this cut-off value were 9.8 times more likely to have joint disease. However, a synovial D-dimer concentration below this value did not rule out joint disease.

samples, D-dimer concentration was not altered (18).

The logistic regression model used in this study showed that adult horses with joint disease presented a cut-off synovial D-dimer concentration of 20,000 ng/mL. This means that horses with a synovial D-dimer concentration above this cut-off value were 9.8 times more likely to have joint disease. However, a synovial D-dimer concentration below this value does not rule out joint disease. The scatter plot graph with the individual data points (Figure 3) clearly shows that if a cut off value of 20,000 ng/mL is used, many false negative interpretations in both the OCD and OA groups occur. Accurate evaluation of the sensitivity and specificity of the proposed cut-off value requires further investigation and comparisons with other horse populations.

Regarding standard synovial fluid variables, the fact that TNCC and TP were significantly lower and higher, respectively, in both OCD and OA groups compared to controls is surprising and the authors cannot give a compelling explanation of these observations. However, we do not consider these differences relevant as the TNCC and TP values in both diseased groups were all within normal ranges (<500-1000 cells/µL and <2.5 g/dl). We would like to highlight that if we had assessed the clinical joints based only in these standard synovial fluid parameters, none of the joints in this study would have been considered pathologic. Conversely, 13/22 of the OCD joints and 6/12 were classified as pathologic with the cut off value suggested in this study. Again, accurate evaluation of the sensitivity and specificity of the proposed cut-off value requires further investigation and comparisons with other horse populations.

Although the D-dimer test has been validated for several animal species, and specifically for horse plasma, this test has not been scientifically validated for synovial fluid in any species yet (27). The decision to use the latex agglutination kits by researchers in our group was based in part on the findings of another study in which comparisons for plasma in foals were made (27). However, definitive validation of the latex agglutination kit for D-dimer measurement in synovial fluid will be

necessary for ongoing investigations of intra-synovial fibrinolytic pathway activation.

Finally, several studies in experimental animals provide evidence to support the importance of an efficient fibrinolytic activity in the resolution of joint diseases and therefore confirming the presence of this activity in equine joints, possibly as a protective mechanism, may warrant further investigation. Induction of arthritis in experimental mice was proved by enhancing coagulation and persistent synovial fibrin deposition in joints after inducing a urokinase-deficiency (fibrinolysis deficient model) in these mice (12). Conversely, it has also been demonstrated that mice with a plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) deficiency (accentuated synovial fibrinolysis model) show an increased synovial fibrinolysis, which leads to reduced fibrin accumulation in arthritic joints and reduced severity of the experimentally induced arthritis (11).

In conclusion, the results of this study show that activation of coagulation and fibrinolysis pathways may play a role in the pathophysiology of both equine OCD and OA, which is evidenced by the presence of a high synovial D-dimer concentration in horses within affected joints. However, until a larger population of horses is studied, this increase can only be considered significant in OCD horses. This test does not replace other tissue biomarker determinations and, although it is more sensitive for the diagnosis of joint diseases than routine synovial fluid analysis alone, its clinical utility for assessing degenerative arthropathies at the moment remains uncertain. However, finding a therapeutic approach to reduce articular fibrin deposition by enhancing the fibrinolytic activity in the diseased equine joint could be an interesting future target.

Acknowledgments

Data from this study were partially presented at the Annual Congress of the European College of Veterinary Surgery (ECVS), in Helsinki (Finland), July 2010.

Conflict of interest

None declared

References

1. Cruz AM, Hurtig MB. Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract* 2008; 24: 101-116.
2. Keegan KG. Evidence-based lameness detection and quantification. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2007; 23: 403-423.
3. Declercq J, Martens A, Maes D, et al. Dorsoproximal proximal phalanx osteochondral fragmentation in 117 Warmblood horses. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 1: 1-6.
4. Lacingtola L, Fanizzi FP, Francioso E, et al. 1H NMR investigation of normal and osteoarthritic synovial fluid in the horse. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008; 1: 85-88.
5. Isola M, Ferrari V, Miolo A, et al. Nerve growth factor concentrations in the synovial fluid from healthy dogs and dogs with secondary osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011; 4: 279-283.
6. So AK, Varisco PA, Kemkes-Matthes B, et al. Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2510-2515.
7. Busso N, Hamilton JA. Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2268-2279.
8. Barnhart MI, Riddle JM, Bluhm GB, et al. Fibrin promotion and lysis in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 1967; 26: 206-218.
9. McIlwraith CW. General pathobiology of the joint and response to injury. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia: WB Saunders; 1996. pg. 40-70.
10. van Weeren PR, Firth EC. Future tools for early diagnosis and monitoring of musculoskeletal injury: biomarkers and CT. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2008; 24: 163-175.
11. Van Ness K, Chobaz-Péclat V, Castellucci M, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 deficiency attenuates murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology* 2002; 41: 136-141.
12. Busso N, Péclat V, Van Ness K, et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 41-50.
13. ((AUTHORS)), et al. **Synovial fibrinolysis activity in foals with septic joint disease. ((JOURNAL)) 2011; 25: 1113-1117.**
14. Bertone AL. Infectious Arthritis. In: *Joint Disease in the Horse*. McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Philadelphia: Saunders; 1996. pg. 397-409.
15. Armengou L, Monreal L, Tarancón I, et al. Plasma D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 411-417.
16. Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal fibrinolytic activity in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 882-889.
17. Armengou L, Monreal L, Segura D, et al. Plasma D-dimers in horses with colic. In: Proceedings of the 8th International Equine Colic Research Sym-

- posium; 2005 ((MONTH, DAYS));((LOCATION – CITY, COUNTRY)). pg. 1.
18. Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. Effect of blood contamination on peritoneal D-dimer concentration in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1232-1238.
 19. Cesarini C, Monreal L, Segura D, et al. Hemostatic follow up of horses with medical and surgical colic [abstract]. In: Proceedings of the 3rd Congress of the European College of Equine Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 434.
 20. Mahaffey EA. Synovial Fluid. In: Cowell RL, Tyler RD, editors. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*. 2nd ed.. St Louis: Mosby; 2002. pg. 163-170.
 21. Attur MG, Dave M, Akamatsu M, et al. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 1-4.
 22. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1357-1360.
 23. Brommer H, René van Weeren, P Brama, et al. Quantification and age-related distribution of articular cartilage degeneration in the equine fetlock joint. *Equine Vet J* 2003; 35: 697-701.
 24. Monreal L, Anglés A, Espada Y, et al. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet J* 2000; Suppl 32: 19-25.
 25. Feige K, Kästner SBR, Dempfle CE, et al. Changes in coagulation markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. *J Vet Med A* 2003; 50: 30-36.
 26. Dallap BL, Dolente B, Boston R. Coagulation profiles in 27 horses with large colon volvulus. *J Vet Emerg Crit Care* 2003; 13: 215-225.
 27. Stokol T, Erb HN, de Wilde L, et al. Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrin(ogen) degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 375-382.



DISCUSIÓN

- Discusión -

Los resultados de esta tesis confirman que se puede determinar la actividad fibrinolítica en el líquido sinovial del caballo mediante la determinación de la concentración de dímero-D sinovial, y que ésta aumenta de forma más o menos marcada en función de la patología articular evaluada. Esta técnica había sido validada anteriormente en un estudio realizado previamente con líquido peritoneal de caballos con cólico²⁹ donde se concluyó que mediante la medición de la concentración peritoneal de dímero-D es posible determinar la actividad fibrinolítica peritoneal en caballos con cólico y que ésta es marcadamente mayor en aquellos casos con alteraciones gastrointestinales severas. Desde hace tiempo en medicina humana se utiliza la determinación de la concentración de dímero-D en diferentes fluidos corporales, incluido en el líquido sinovial², para determinar la actividad fibrinolítica local y se ha comprobado su utilidad como marcador en el diagnóstico de determinadas patologías^{42,48}.

De acuerdo con nuestra primera hipótesis, los resultados muestran que la mayoría de caballos con patología articular (OCD, OA y AS) presentan concentraciones de dímero-D sinovial elevadas (OCD y OA) o extremadamente elevadas (AS). Sin embargo, los caballos con OA, a pesar de mostrar una concentración muy parecida (21.440 (6.641- 50.092) ng/mL) a la de articulaciones con OCD (25.172 (8.472- 73.472) ng/mL), no es significativamente mayor a la de caballos sin patología articular (12.858 (5.794-17.780 ng/mL), contrariamente a nuestra hipótesis inicial. Tal vez esté relacionado con el hecho que la OA tiene un menor componente inflamatorio

⁴⁸ Lü YD, Chen P, Xu M. Detection of D-dimer in pleural effusion. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2000; 25(1):71-2.

en su fisiopatología articular, aunque también es necesaria una población mayor de caballos para contrastar estos resultados. Lo discutiremos un poco más adelante.

La concentración de dímero-D sinovial en los potros con AS, no sólo es mucho mayor que la de los potros sin patología articular, sino que también lo es comparada con la de los caballos con OCD o OA. En medicina humana desconocemos que haya estudios previos que hayan determinado la concentración de dímero-D sinovial en pacientes con AS, aunque sí se ha demostrado que pacientes humanos con RA² presentan concentraciones extremadamente elevadas, comparable a las obtenidas en los potros con AS.

Nuestros resultados coinciden con el único estudio que se ha descrito en pacientes humanos en el que documentaron la activación de la cascada de coagulación y la fibrinólisis en el líquido sinovial y plasma de pacientes con patologías articulares tanto inflamatorias como degenerativas, y evidenciaron que la actividad fibrinolítica era mayor en las patologías articulares inflamatorias como la RA². El aumento tan marcado de la concentración de dímero-D sinovial observado en las articulaciones infectadas (AS) respecto a las no infectadas (OCD y OA) de los caballos de ambos estudios confirman: 1) que la inflamación local activa la coagulación sinovial y 2) que a mayor grado de inflamación articular, mayor es el incremento de la actividad fibrinolítica sinovial cuya función es minimizar el depósito de fibrina en la cavidad articular² y así reducir la respuesta inflamatoria articular^{1,3,21, 22}. Estos hallazgos coinciden con lo que se ha descrito en pacientes humanos, en los que la RA es la patología articular con el componente inflamatorio más fuerte y precisamente la que más actividad fibrinolítica presenta comparada con el resto de patologías articulares estudiadas².

Un hecho sorprendente es la elevada concentración de dímero-D sinovial basal obtenida de los caballos adultos y potros sin patología articular. Esta concentración de dímero-D sinovial es mucho más elevada que las concentraciones normales y patológicas de dímero-D descritas en otros fluidos corporales como el plasma^{27,28}, líquido pleural⁴², peritoneal²⁹, y cefalorraquídeo⁴⁴ de humanos, caballos y perros, respectivamente. Desafortunadamente, no se han encontrado referencias publicadas que describan concentraciones basales de dímero-D sinovial en humanos sin patología articular para poder contrastarlas con nuestros resultados. Estas diferencias basales observadas entre los diferentes fluidos corporales quizá se deba a diferencias específicas en la permeabilidad vascular de cada membrana. Así mismo, posibles diferencias fisiológicas del endotelio o de la permeabilidad vascular sinovial entre potros y caballos adultos quizá podrían explicar la diferencia observada entre niveles basales de la concentración de dímero-D sinovial entre adultos y potros.

El análisis rutinario del líquido sinovial (RTCB, PT, % de neutrófilos y citología) es, de momento, el más útil en la clínica veterinaria para diagnosticar artritis séptica en el caballo⁴⁹, aunque recientemente se han descrito nuevos biomarcadores sinoviales que en un futuro podrían ser útiles³⁷. Nuestros resultados confirman que los potros con infección articular presentan un RTCB y una concentración de dímero-D sinovial muy elevados, como sospechábamos. Sin embargo, los caballos con patología articular no-infecciosa (OCD y OA) sólo muestran un aumento de la concentración sinovial de dímero-D mientras que los valores de RTCB permanecen en el rango de normalidad. Esto significa que la correlación entre el RTCB y la concentración de dímero-D sinovial es baja, como se ha observado en el líquido sinovial de pacientes humanos con artritis² o con efusión pleural⁴² o en el líquido cefalorraquídeo del perro⁴⁴. Estos

⁴⁹ Steel CM. Equine synovial fluid analysis. *Vet Clin Equine* 2008; 24: 437-454.

hallazgos demuestran una mayor sensibilidad de la determinación de dímero-D sinovial respecto al RTCB y apuntan una ventaja a favor de la utilidad del dímero-D.

Si el diagnóstico de patología articular no infecciosa hubiera dependido sólo de los parámetros rutinarios del análisis del líquido sinovial, ninguna de las articulaciones afectadas hubiera sido diagnosticada como patológica. Contrariamente, la determinación de dímero-D de los mismos casos hubiera diagnosticado como articulación patológica a 13/22 (59%) de las articulaciones con OCD y 6/12 (50%) de las articulaciones con OA, considerando como valor de corte la concentración de dímero-D sinovial de 20.000 ng/mL. Estos resultados demuestran que la determinación de la concentración de dímero-D sinovial es más sensible que la determinación de RTCB para detectar patología articular.

Los resultados del estudio con caballos con OCD y OA han permitido establecer que una concentración de dímero-D sinovial por encima de 20.000 ng/mL indica que hay 9,8 veces más probabilidad de la existencia de patología articular. Sin embargo, una concentración menor de momento no permite descartar la existencia de patología articular. De todas formas, consideramos que éste es un valor preliminar y que es necesaria una población mayor de caballos para validar o refutar este resultado.

Durante este periodo se ha podido seguir la evolución de la concentración de dímero-D sinovial de muestras extraídas durante y después del tratamiento médico y quirúrgico de algunos de los pacientes de ambos estudios, pero los resultados no son concluyentes puesto que no existe homogeneidad en el tratamiento instaurado ni en el tiempo de extracción de las muestras sinoviales de los pacientes. Sin embargo, hemos determinado la concentración de dímero-D en el líquido sinovial de tres caballos de

experimentación que servían como controles de otro estudio a los que se les creó artroscópicamente una lesión condral en ambas articulaciones tarsocrurales. Se determinó la concentración de dímero-D sinovial antes de comenzar la artroscopia, 3 semanas después de inducir la lesión y 7 meses después de reposo activo en un prado. A pesar del número reducido de animales los resultados muestran que la concentración de dímero-D sinovial aumentaba y permanecía elevada al menos 3 semanas después de padecer una agresión articular y que 7 meses después del reposo los niveles volvían a los valores basales.

Hemos mencionado anteriormente que la concentración basal de dímero-D sinovial de los potros sin infección articular (sanos y septicémicos) está por encima del valor de normalidad (20.000 ng/mL) y tal vez es debido a diferencias fisiológicas en la permeabilidad vascular sinovial entre caballos adultos y neonatos. Otra teoría, es que la condición sistémica alterada de los potros septicémicos pudiera ser la causa del aumento basal en la concentración de dímero-D sinovial en los potros neonatos debido a una extravasación del plasma hacia la articulación. En nuestra opinión, esta teoría es muy poco probable por dos motivos: 1) para que esto suceda, la concentración de dímero-D plasmática de los potros debería ser mucho más alta que la sinovial, y esta situación es inviable teniendo en cuenta que la máxima concentración plasmática descrita en potros muy septicémicos²⁸ no llega a una quinceava parte de la concentración de dímero-D sinovial de los potros sanos. Incluso la concentración plasmática de caballos adultos extremadamente enfermos²⁷ es sólo un poco más de la mitad de la concentración sinovial de los caballos sin patología articular; 2) un estudio realizado con pacientes humanos con artritis demuestra que la extravasación de dímero-D ocurre a la inversa, es decir, de la articulación afectada al plasma². Sus resultados revelan que la concentración plasmática de dímero-D de los pacientes

artríticos es hasta 10 veces mayor que la del plasma de los pacientes sanos. Todos estos argumentos justifican que decidiéramos no determinar valores plasmáticos de dímero-D en nuestros pacientes.

La población de potros con artritis séptica en este estudio es pequeña y no permite determinar un valor de corte de concentración de dímero-D sinovial a partir del cual se pueda establecer el diagnóstico de AS y diferenciarla de una inflamación articular no infecciosa severa. Con este mismo objetivo se ha descrito recientemente un trabajo en caballos que describe la utilidad de la mieloperoxidasa sinovial como biomarcador³⁷ para realizar dicha discriminación.

Hemos observado que el rango de valores de normalidad y patología de la concentración de dímero-D en el líquido sinovial tanto del caballo como de personas es mayor y más amplio que la de los otros fluidos corporales. Pensamos que factores como la edad⁵⁰, la articulación afectada o la severidad del proceso articular podrían justificar esta variabilidad. Sin embargo, el hecho de que esta variabilidad también se haya observado en la concentración sinovial de los caballos adultos del grupo control donde todos los animales tenían la misma edad (2 años), el líquido sinovial provenía de la misma articulación (menudillo), y en el examen post-mortem todas las articulaciones estaban aparentemente sanas, cuestiona la teoría sobre la influencia de estos factores sobre la concentración de dímero-D sinovial. Desconocemos si las fuerzas biomecánicas a las que están expuestas determinadas articulaciones podrían justificar esta diferencia.

⁵⁰Brommer H, René van Weeren, P Brama, et al. Quantification and age-related distribution of articular cartilage degeneration in the equine fetlock joint. *Equine Vet J* 2003; 35: 697-701.

Por último, la determinación cuantitativa o semi-cuantitativa de dímero-D es un test rápido, económico y práctico, y su uso es factible a nivel clínico. La determinación de la concentración de dímero-D sinovial ha demostrado ser un marcador más sensible que los parámetros que se analizan de forma rutinaria en el líquido sinovial para detectar la presencia de patología articular no infecciosa, y un marcador complementario para el diagnóstico de caballos con AS. En un futuro, ampliando la población de estudio, es posible que se pueda determinar un valor de corte que permita diferenciar entre patología articular inflamatoria e infecciosa. Finalmente, la investigación de métodos para reducir el depósito de fibrina y estimular la actividad fibrinolítica en las patologías articulares, especialmente las altamente inflamatorias e infecciosas, podría ofrecer una nueva alternativa terapéutica articular.



CONCLUSIONES

- Conclusiones -

CONCLUSIONES

1. La determinación de la concentración de dímero-D sinovial evidencia la activación articular de la cascada de la coagulación y de la fibrinólisis tanto en patologías articulares de desarrollo (OCD) y degenerativas (OA) del caballo adulto como en la patología articular infecciosa (AS) del potro.
2. La artritis séptica en el caballo va acompañada de un aumento muy marcado de la concentración sinovial de dímero-D, y evidencia una marcada activación fibrinolítica en la articulación afectada.
3. La concentración sinovial de dímero-D es mucho mayor en la AS del potro que en la OA o OCD del caballo adulto.
4. La determinación de la concentración sinovial de dímero-D puede ser útil como marcador de patología articular.
5. La determinación de la concentración de dímero-D en el líquido sinovial puede ser un marcador complementario para el diagnóstico de AS en caballos.
6. Los caballos con OCD y OA presentan una elevada concentración de dímero-D sinovial, y evidencia en ambos una elevada actividad fibrinolítica sinovial en las articulaciones afectadas. Sin embargo, la concentración de dímero-D sinovial sólo es significativamente mayor en caballos con OCD.

7. Una articulación con una concentración de dímero-D sinovial ≥ 20.000 ng/mL tiene 9,8 veces más probabilidades de padecer patología articular que una con una concentración menor. Sin embargo, una concentración más baja no excluye patología articular.
8. Un aumento en el RTCB sinovial implica un aumento en la concentración sinovial de dímero-D, pero, el aumento en la concentración sinovial de dímero-D no siempre está asociado al aumento del RTCB sinovial.
9. Se requieren más estudios para llegar a determinar si una determinada concentración sinovial de dímero-D podría diferenciar entre patología articular inflamatoria e infecciosa.
10. La activación de la cascada de coagulación y de la fibrinólisis en el líquido sinovial desempeñan un papel en la fisiopatología articular de caballos con OCD, OA y AS.



RESUMEN

La patología articular en el caballo provoca, a corto o largo plazo, cojera en el caballo y es motivo de importantes pérdidas económicas en el mundo deportivo ecuestre. La fisiopatología articular en el caballo comporta una serie de procesos bio-patológicos que, si no se detectan y tratan a tiempo, generan un ciclo catabólico autodestructivo que induce la degradación de los propios tejidos articulares.

Estudios de medicina humana hace tiempo que han demostrado mediante la determinación de marcadores hemostáticos, y más recientemente, de la concentración de dímero-D sinovial, que existe una activación generalizada tanto de la fibrinólisis como de la cascada de la coagulación en la articulación artrítica que están relacionadas con la inflamación articular. Sin embargo, no hay nada descrito en caballos ni en el resto de especies animales sobre la determinación de la concentración de dímero-D en el líquido sinovial, y lo poco que hay descrito sobre los procesos fisiopatológicos relacionados con la coagulación intra-articular son extrapolaciones de medicina humana.

El dímero-D es un producto específico de la fibrinólisis que resulta sólo de la degradación de la fibrina estable y su presencia es indicativa de la formación previa de un coágulo.

Nuestros estudios, realizados con caballos con patologías articulares frecuentes como la OCD, la OA y la artritis séptica (AS), han permitido determinar y evidenciar por primera vez y mediante la determinación de la concentración de dímero-D sinovial, la activación de la fibrinólisis sinovial en respuesta a la activación de la cascada de la coagulación en las articulaciones afectadas del caballo, y que varía independientemente de la presencia de enfermedad sistémica en el caballo. Hemos

podido comprobar que la concentración de dímero-D sinovial (activación fibrinolítica sinovial) aumenta considerablemente en los caballos con OCD y OA, sobretodo con OCD, y que en los casos con AS este aumento es muchísimo más destacado que en el resto de artritis. Esto demuestra que la actividad fibrinolítica sinovial aumenta de forma más o menos marcada en función de la inflamación articular.

La determinación de la concentración de dímero-D sinovial ha demostrado ser un marcador más sensible que el análisis del recuento total de células blancas (RTCB) del líquido sinovial para detectar la presencia de patología articular no infecciosa. Estos hallazgos apuntan que la determinación de la concentración sinovial de dímero-D puede ser útil como marcador de patología articular. En un futuro, ampliando la población de estudio, es posible que se pueda determinar un valor de corte que permita diferenciar entre patología articular inflamatoria e infecciosa.

En conclusión, la activación de la cascada de coagulación y de la fibrinólisis en el líquido sinovial desempeñan un papel en la fisiopatología articular de caballos con OCD, OA y AS. La determinación cuantitativa o semi-cuantitativa de dímero-D es un test rápido, económico y práctico, y su uso es factible a nivel clínico para determinar patología articular en el caballo. Finalmente, la investigación de métodos para reducir el depósito de fibrina y estimular la actividad fibrinolítica en las patologías articulares, especialmente las altamente inflamatorias e infecciosas, podría ofrecer una nueva alternativa terapéutica articular.

SUMMARY

- Summary -

Equine joint pathology usually results in lameness which is one of the most important reasons for significant economic losses in the equestrian sport world. The biopathological events involved in joint disease generate a catabolic cycle which causes joint tissue degeneration if left uncontrolled.

Human studies have demonstrated the relationship between joint inflammation and the hemostatic and the fibrinolytic pathway activation, and secondly that this can be measured by D-dimer concentration determination in synovial fluid.

Neither the confirmation of the activation of these two pathways as part of the pathophysiology of joint disease, nor the measurement of D-dimer concentration in synovial fluid have been reported in other species, including equine, although extrapolations from human medicine have been made.

D-dimers are specific fibrinolysis byproducts resulting from stable fibrin degradation only and their presence confirms previous clot formation.

These studies, which include horses with different types of joint disease like OCD, OA and septic arthritis have confirmed that a fibrinolytic process occurs within the joint in response to the coagulation pathway activation in diseased joints, independently of the presence of systemic disease. We have documented a significant rise in synovial D-dimer concentration (synovial fibrinolytic activation) both in OCD and OA affected horses, and more so in horses with OCD, and furthermore, this rise has been observed as being markedly more prominent in septic arthritis patients. This shows that synovial fibrinolysis activity rises in function of the degree of inflammation.

Synovial D-dimer concentration determination has proven to be a more sensitive marker than total nucleated cell count (TNCC) for the detection of non-infectious joint disease. However, further investigation and inclusion of a larger group of horses for study are necessary to be able to give a valid cutoff point useful to differentiate between septic and inflammatory joint disease.

In conclusion, both the coagulation and the fibrinolytic pathways play a role in equine joint pathophysiology, in namely OCD, OA and septic arthritis patients. The quantitative or semi-quantitative D-dimer determination is a quick, practical and inexpensive test for the diagnosis of joint pathology in the horse. Finally, investigating ways in which to reduce fibrin deposition and stimulate fibrinolysis activity within diseased joints may offer a new therapeutic alternative especially in highly inflammatory and in septic joint conditions.



REFERENCIAS

- Referencias -

1. McIlwraith CW. General pathobiology of the joint and response to injury. In: Joint Disease in the Horse. McIlwraith CW, Trotter GW (eds). Philadelphia: WB Saunders 1996; 40-70.
2. SoAK, Varisco PA, Kemkes-Matthes B, et al. Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. J Thromb Haemost 2003; 1: 2510-2515.
3. Bertone AL. Infectious Arthritis. In: Joint Disease in the Horse. McIlwraith CW, Trotter GW (eds). Philadelphia: Saunders 1996; 397-409.
4. Mankin HJ, Radin E. Structure and function of joints. In: Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology (Second ed). McCarty DJ (ed). Philadelphia: Lea & Febiger 1993; 181-210.
5. Thornton GM, Shrive NG, Frank CB. Healing ligaments have decreased cyclic modulus compared to normal ligaments and immobilization further compromises healing ligament response to cyclic loading. J Orthop Res 2003; 21: 716-722.
6. Todhunter RJ. Anatomy and physiology of synovial joints. In Joint Disease in the Horse. McIlwraith CW, Trotter GW, (eds). Philadelphia: WB Saunders 1996; 1-28.
7. Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Local hemodynamics, permeability and oxygen metabolism of innervated and denervated isolated equine joints. Am J Vet Res 1998; 59(10):1307-1316.
8. Bertone AL. Joint Physiology: responses to exercise and training. In Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor JR (eds): Equine Sports Medicine and Surgery. Saunders Elsevier 2004; 152-160.

9. Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Joint pressure influences synovial blood flow as determined by colored microspheres. *J Appl Physiol* 1996; 80:1225-1232.
10. Richman AI, Su EY, Ho G. Reciprocal relationship of synovial fluid volume and oxygen tension. *Arthritis Rheum* 1981; 24:701-705.
11. Frisbie DD. Synovial joint biology and pathobiology. In: *Equine surgery* (Fourth ed). Auer JA, Stick JA (eds). St Louis: Elsevier Saunders 2012; 1096-1114.
12. Kim YJ, Sah RLY, Grodzinsky AJ, et al. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 311:1-12.
13. Wilkins RJ, Fairfax TP, Davies ME, et al. Homeostasis of intracellular Ca²⁺ in equine chondrocytes: response to hypotonic shock. *Equine Vet J*. 2003; 35(5):439-443.
14. Skiöldebrand E, Heinegard D, Olofsson B, et al. Altered homeostasis of extracellular matrix proteins in joints of standardbred trotters during a long-term training programme. *J Vet Med*. 2006; 53:445-449.
15. Kawcak CE, McIlwraith CW, Norrdin RW, et al. Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints in horses. *Am J Vet Res* 2000; 61:1252- 1258.
16. USDA. National economic cost of equine lameness, colic, and equine protozoal myeloencephalitis in the United States. USDA:APHIS:VS, National Health Monitoring System. Information sheet. Fort Collins (CO): October, 2001. #N348.1001.
17. Weissman G. Lysosomes in joint disease. *Arthritis Rheum* 1966; 10:834-840.
18. Loyau G, Pujol JP. The role of cytokines in the development of osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1990; 81:8-12.

19. Curtiss PH, Jr, Klein L. Destruction of articular cartilage in septic arthritis: I. In vitro studies. *J Bone Joint Surg Am* 1963; 45-A:797-806.
20. Lack ACH, Anderson AJ, Les Y, et al. Action of plasmin on cartilage matrix in vivo. *Nature* 1961; 191:1402-1403.
21. Busso N, Hamilton JA. Extravascular coagulation and the plasminogen activator/plasmin system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2268-2279.
22. Barnhart MI, Riddle JM, Bluhm GB, et al. Fibrin promotion and lysis in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 1967; 26: 206-218.
23. Hoylaerts M, Rijcken DC, Lijen HR, et al. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982; 257:2912-2919.
24. Whawell SA, Thompson JN. Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells. *Eur J Surg* 1995; 161:315-317.
25. Stokol T, Erb HN, De Wilde L, et al. Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrin(ogen) degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic. *Vet Clin Pathol* 2005; 34:375-382.
26. Monreal L. D-dimer as a new test for the diagnosis of DIC and thromboembolic disease. *J Vet Intern Med* 2003; 17:757-759.
27. Cesarini L, Monreal L, Armengou L, et al. Association of Admission Plasma D-Dimer Concentration with Diagnosis and Outcome in Horses with Colic. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1490-1497.
28. Armengou L, Monreal L, Tarancón I, et al. Plasma D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med* 2008; 22:411-417.

29. Delgado MA, Monreal L, Armengou L, et al. Peritoneal D-dimer concentration for assessing peritoneal fibrinolytic activity in horses with colic. *J Vet Intern Med* 2009; 23:882-889.
30. Francis CW, Marder VJ. A molecular model of plasminic degradation of crosslinked fibrin. *Semin Thromb Hemost* 1982; 8:25-35.
31. Kroneman H, Nieuwenhuizen W, Knot EAR. Monoclonal antibody-based plasma assays for fibrin(ogen) and derivatives, and their clinical relevance. *Blood Coagul Fibrinol* 1990; 1:91-111.
32. USDA. Lameness and laminitis in U.S Horses. USDA: APHIS:VS, CEAH. National Animal Health Monitoring System. Fort Collins (CO): 2000. #N318.0400.
33. Caron JP, Genovese RL. Principles and practices of joint disease treatment. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the horse*. Ross MW, Dyson SJ (eds): Philadelphia, WB Saunders Company 2003; 746-64.
34. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther*. 2002; Jan 9(1):12-20.
35. Eyre DR, Weis MA, Moskowitz RW. Cartilage expression of a type II collagen mutation in an inherited form of osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia 1991; 87:357-361.
36. McIlwraith CW. What is the developmental orthopedic disease, osteochondrosis, osteochondritis, metabolic bone disease? *Proc Am Assoc Equine Practnr* 1993; 39:35-44.

37. Barrie HJ. Osteochondritis dissecans 1887-1987: A centennial look at König's memorable phrase. *J Bone Joint Surg Br* 1987; 69B(5):693-695.
38. Wauters J, Martens A, Pille F, et al. Equine myeloperoxidase: a novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infection; *EJV* 2012 (IN PRESS).
39. McIlwraith CW. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J* 2005; 37:473-482.
40. Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cart* 2008; 16:1196-1204.
41. Monreal L, Anglés A, Espada Y, et al. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet J Suppl* 2000 32:19-25.
42. Cesarini C, Monreal L, Segura D, et al. Hemostatic follow up of horses with medical and surgical colic. *J Vet Intern Med* 2009; 23:434 (abstract).
43. Philip-Joët F, Alessi MC, Philip-Joët C, et al. Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions. *Eur Respir J* 1995; 8(8):1352-6.
44. Escanilla N, Leiva M, Peña MT, et al. Aqueous humor fibrinolytic activity in dogs with cataracts. *Veterinary Ophthalmology* 2012. (ACCEPTED).
45. De la Fuente C, Monreal L, Añor S, et al. Fibrinolytic Activity in Cerebrospinal Fluid of Dogs with Different Neurological Disorders. *J Vet Intern Med* 2012; (IN PRESS).
46. Busso N, Péclat V, Van Ness K, et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102:41-50.

47. Van Ness K, Chobaz-Péclat V, Castellucci M, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 deficiency attenuates murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology* 2002; 41:136-141.
48. Lü YD, Chen P, Xu M. Detection of D-dimer in pleural effusion. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2000; 25(1):71-2.
49. Steel CM. Equine synovial fluid analysis. *Vet Clin Equine* 2008; 24: 437-454.
50. Brommer H, René van Weeren, P Brama, et al. Quantification and age-related distribution of articular cartilage degeneration in the equine fetlock joint. *Equine Vet J* 2003; 35: 697-701.

