

OBSERVACIONES SUBMICROSCÓPICAS DEL LIQUIDO SINOVIAL  
EN UN CASO DE ARTRITIS REUMATOCIDEA

— **Dr. Hernán Fereira V.**

— **Dr. Orlando J. Castejón.**

Instituto de Investigación Clínica.  
Apartado 1151.  
Universidad del Zulia.  
Maracaibo, Venezuela.

## INTRODUCCION

Desde hace varios años se conocen las alteraciones en la estructura de los polimorfonucleares, de pacientes con estados inflamatorios. Dichas alteraciones consisten principalmente en la existencia de granulaciones tóxicas, vacuolas y cuerpos de inclusión. El número y tamaño de estas estructuras es proporcional a la severidad de la enfermedad. Se han incriminado dos hechos para explicar el origen de estas inclusiones: 1º, que representan sustancias tóxicas tomadas o incorporadas por las células; 2º, que son el resultado de una falta de maduración, la cual puede estar asociada con la leucopoyesis acelerada observada en los estados inflamatorios<sup>6, 7, 12</sup>.

Recientemente, Hollander y col.<sup>8</sup> han descrito inclusiones citoplasmáticas en los leucocitos polimorfonucleares del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea. Delbarre y col.<sup>5</sup> denominaron ragicitos, a estos leucocitos con inclusiones voluminosas. Igualmente, estas inclusiones han sido descritas en los polimorfonucleares de la sangre periférica de dichos pacientes, así como también en los linfocitos. Se ha considerado que las inclusiones observadas en los leucocitos de pacientes con artritis reumatoidea, representan un precipitado de gammaglobulina fagocitada<sup>4</sup>.

En 1966, Zucker-Franklin<sup>15</sup> describe, al microscopio de luz y electrónico, la presencia de fagosomas en el citoplasma de los leucocitos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea. En vista de la información escasa existente en este campo y queriendo ampliar el conocimiento sobre estos hallazgos, hemos estudiado las alteraciones ultraestructurales de los leucocitos y del contenido extracelular del líquido sinovial en la artritis reumatoidea.

## MATERIAL Y METODO

Se obtuvo el líquido sinovial de un paciente con artritis reumatoidea clásica, según los criterios aceptados por la Asociación Americana de Reumatología, donde los exámenes de laboratorio utilizados para comprobar el diagnóstico de artritis reumatoidea fueron positivos, y con elementos celulares conteniendo el tipo de inclusión descrita por Hollander al microscopio de luz. El sitio de la punción fue la rodilla, utilizando jeringa heparinizada.

Las células fueron sedimentadas por centrifugación durante 5 minutos. Después de eliminar el líquido sobrenadante se hizo fijación en solución al 4% de glutaraldehído en fosfato de sodio 0,1 M, a pH de 7,4. Se realizó luego fijación en tetraóxido de osmio al 1%, en solución reguladora similar, e inclusión en Epón. Se obtuvieron secciones finas con ultramicrotomo LKB, las cuales se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron con microscopio Siemens Elmiskop I. Las medidas de las microfotografías se hicieron con la máquina Universal Cambridge.

## RESULTADOS

### Citoplasma.

Los leucocitos polimorfonucleares muestran en su citoplasma, características submicroscópicas similares a las ya descritas en los polimorfonucleares de la sangre periférica (Fig. 1), tales como retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, complejo de Golgi y lisosomas. Los canalículos del retículo endoplásmico rugoso contienen un material homogéneo, de una densidad electrónica ligeramente mayor que el de la matriz del hialoplasma. Los ribosomas adheridos a la membrana limitante de los canalículos son de un diámetro aproximado de 100 Angstrom (Figs. 1 y 4). Las mitocondrias mostraron los detalles ultraestructurales ya descritos en otros tipos celulares; igualmente el complejo de Golgi muestra el patrón convencional de cisternas aplanadas, no asociadas a ribosomas. Los lisosomas aparecen como cuerpos densos, redondeados u ovals de 0,1 a 0,7 micras de diámetro. En algunas microfotografías electrónicas se observó vacuolización de los lisosomas (Figs. 6, 7 y 11). Los gránulos de glucógeno aparecen distribuidos en todo el citoplasma, y se agru-





Fig. 1. Microfotografía electrónica de un polimorfonuclear neutrófilo del líquido sinovial mostrando las lobulaciones nucleares (N), las mitocondrias (M), el complejo de Golgi (G), los lisosomas (L) y el retículo endoplasmático rugoso (re). Magnificación: 20.000X.

pan con preferencia alrededor de las estructuras globulares (Figs. 3, 7, 8 y 9).

**Fagosomas:** se observó la presencia de fagosomas (Figs. 1, 2, 5, 6 y 7), caracterizados por la presencia de una membrana limitante, conteniendo en su interior perfiles de membranas, material denso de aspecto similar al material fibrinoide observado en el líquido extracelular, espacios vacuolares y restos de citoplasma. Se hallan en todo el citoplasma y tienden a distribuirse hacia la periferia; su tamaño oscila entre 0,5 y 2,5 micras aproximadamente.

**Vacuolas fagocíticas:** se observan vacuolas superficiales (Figs. 4, 6 y 7) cubiertas por una unidad de membrana, cuyo contenido varía; algunas veces es claro, otras veces contiene un material de aspecto semejante al material nuclear, o es de aspecto fibrinoide o proteináceo. Las vacuolas se forman por la emisión de prolongaciones citoplasmáticas de hasta 8,5 micras de longitud; las cuales se unen entre sí englobando el contenido del líquido sinovial. Estas vacuolas parecen representar los estadios iniciales de la formación de los fagosomas.

**Estructuras globulares:** aparecen como inclusiones redondeadas (Figs. 5, 7 y 8), de tamaño de hasta 2,3 micras de diámetro, rodeadas por una fina membrana, alrededor de la cual se disponen gran cantidad de gránulos de glucógeno. Su contenido es homogéneo y grisáceo. Estas estructuras globulares se observan también en el líquido sinovial, fuera de las células. Su tamaño y densidad varían en una misma célula y en algunas se observa un material de aspecto granular, de mayor densidad que el resto del contenido.

**Cuerpos de inclusión:** aparecen dispersos en el citoplasma (Figs. 5, 7 y 11), de forma redondeada, algunas veces de contorno irregular, rodeados por una membrana y conteniendo un material granular compactado; son electrodensos y de hasta 2,7 micras de diámetro. Algunos de estos cuerpos de inclusión parecen constituir fagosomas formados por material fibrinoide.

### **Núcleo.**

El núcleo de los leucocitos muestra el material cromático distribuido preferentemente en la periferia, asociado a la membrana nuclear interna. Este patrón de distribución es ca-



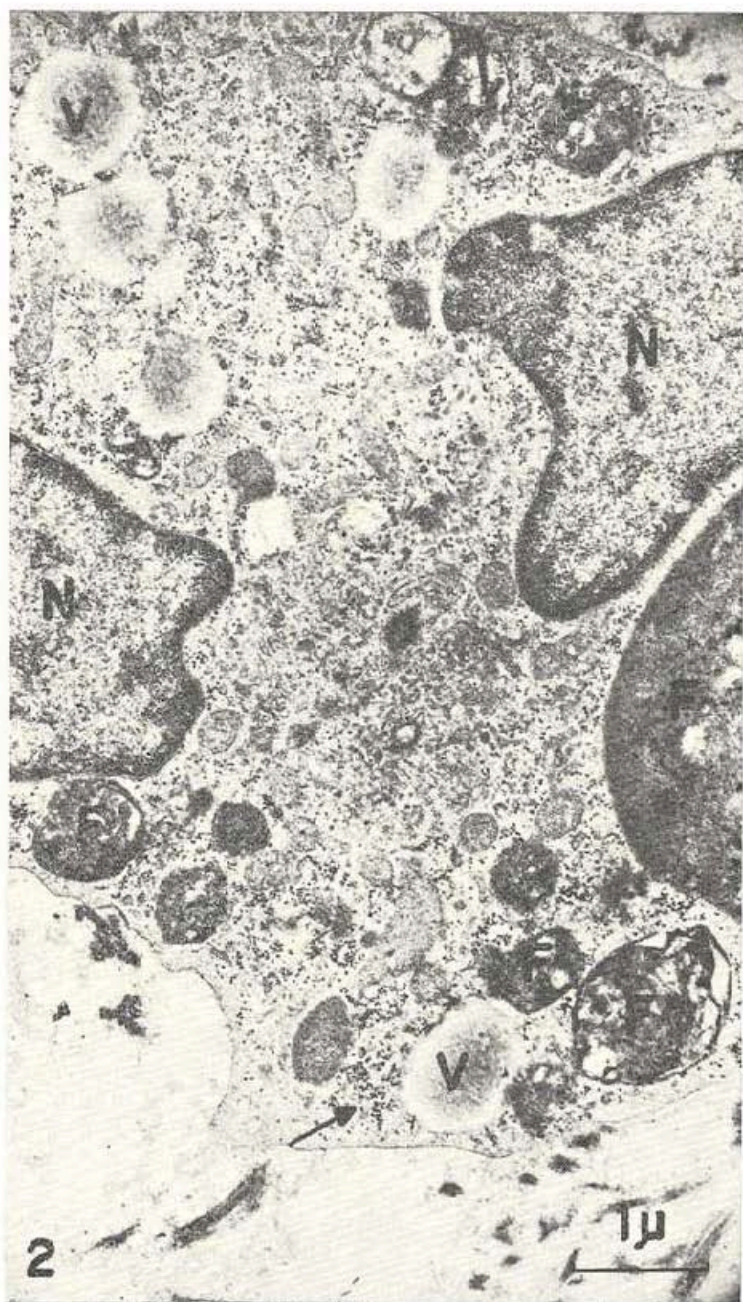


Fig. 2. Polimorfonuclear neutrófilo mostrando las lobulaciones nucleares (N), gránulos de glucógeno (flecha), los fagosomas (F), y vacuolas (V) que contienen un material central, homogéneo, de baja densidad electrónica. Magnificación: 20.000 X.



Fig. 3. Polimorfonuclear neutrófilo mostrando principalmente las lobulaciones nucleares (N), y los gránulos de glucógeno (flechas) distribuidos en todo el citoplasma. Magnificación: 35.000 X.





Fig. 4. Polimorfonuclear neutrófilo mostrando el núcleo (N), los canículos del retículo endoplasmático (re) y los lisosomas (L). Se observa la presencia de una vacuola fagocítica (VF) que contiene un material de aspecto proteináceo. Magnificación: 35.000 X.





Fig. 5. Polimorfonuclear mostrando parte del núcleo (N), los fagosomas (F), y los cuerpos de inclusión densos (C). Obsérvese las prolongaciones pseudopódicas de la superficie celular. Un leucocito vecino muestra una estructura globular (EG). Magnificación: 20.000 X.



Fig. 6. Polimorfonuclear neutrófilo mostrando la fagocitosis del material proteináceo contenido en el espacio extracelular. Las vacuolas fagocíticas (VF1, VF2 y VF3) muestran los estadios sucesivos del proceso de fagocitosis. Nótese la presencia de material proteináceo en VF1 y VF2 y la presencia de perfiles de membranas y material proteináceo en VF3. En la región superior derecha de la microfotografía se observan los fagosomas (F1 y F2). El fagosoma marcado con F2 contiene restos de citoplasma celular que muestra canales del retículo endoplasmático. En la región superior izquierda se observa un lisosoma vacuolizado. Magnificación: 18.000 X.



racterístico de la fijación primaria en glutaraldehído. No se han observado hasta ahora signos de degeneración del material nuclear.

Los leucocitos muestran una actividad fagocítica intensa (Figs. 5, 6, 7, 11, 12 y 13), observándose la existencia de prolongaciones pseudopódicas de hasta 8,5 micras de longitud; las cuales se unen con prolongaciones o se repliegan para formar las vacuolas fagocíticas. Estas prolongaciones pseudopódicas muestran ramificaciones secundarias. Se observó fagocitosis del material de aspecto proteináceo, fibrinoide, y de material semejante al contenido nuclear.

#### **Contenido extracelular.**

Se observa la presencia de un material (Figs. 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15) formado por partículas discretamente electrodenensas y de aspecto proteináceo. En la vecindad de este material se observan fragmentos de membranas celulares, estructuras de aproximadamente 1,7 micras que contienen en su interior material finamente granular. Se observan, además, haces de material fibrilar de hasta 4,5 micras de longitud, constituidos por filamentos distribuidos en sentido paralelo; este material es de aspecto fibrinoide y lo hemos observado adherido a la membrana celular y en vías de ser ingerido por fagocitosis.

Se observa, además, la presencia de organelos e inclusiones celulares, tales como lisosomas, estructuras globulares y productos de la lisis celular.

#### **DISCUSION**

La observación más importante en el presente estudio, es la existencia de polimorfonucleares con fagosomas de contenido variable. La mayoría de estas estructuras se observan también en el líquido sinovial fuera de las células; lo que permite establecer que el material fagocitado proviene del líquido extracelular, representando el producto de la destrucción de los polimorfonucleares de las células existentes en la membrana sinovial, debido al proceso inflamatorio crónico.

Es interesante observar que los canalículos del retículo endoplasmático contienen un material denso, lo cual sugiere que pudiera tratarse de un material sintetizado en el retículo endo-

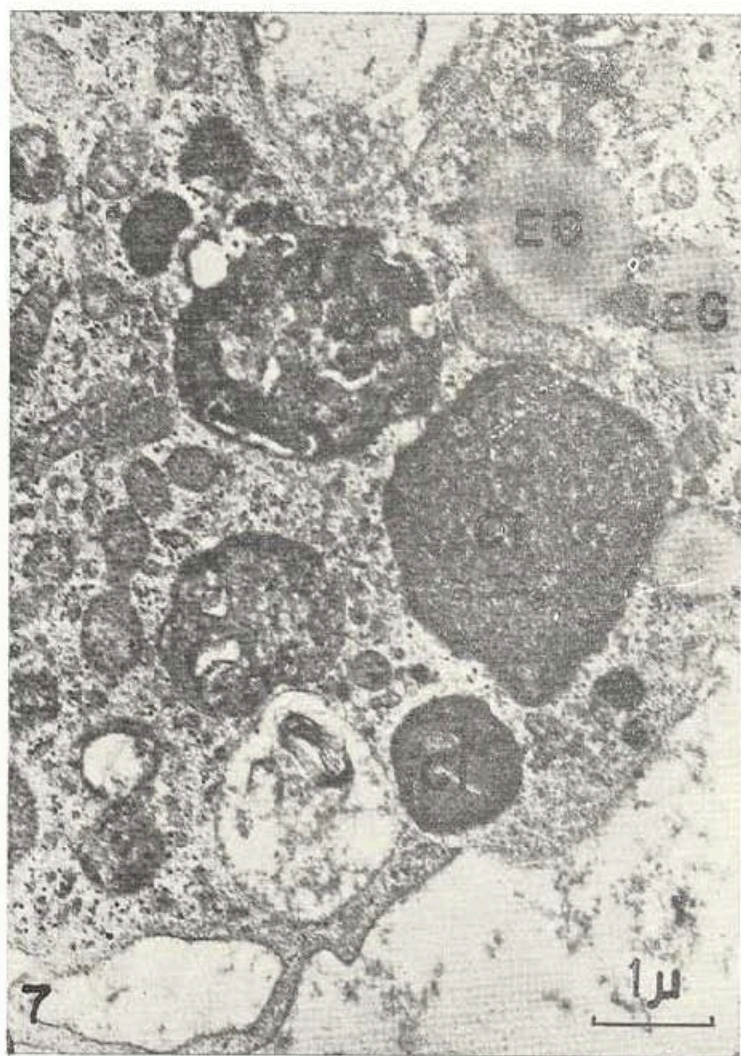


Fig. 7. Microfotografía electrónica de la misma célula ilustrada en la Fig. 6 mostrando la presencia de dos cuerpos de inclusión densos (CI), fuertemente osmiofílicos y de gran tamaño. Se observan además, dos estructuras globulares (EG). Magnificación: 18.000 X.



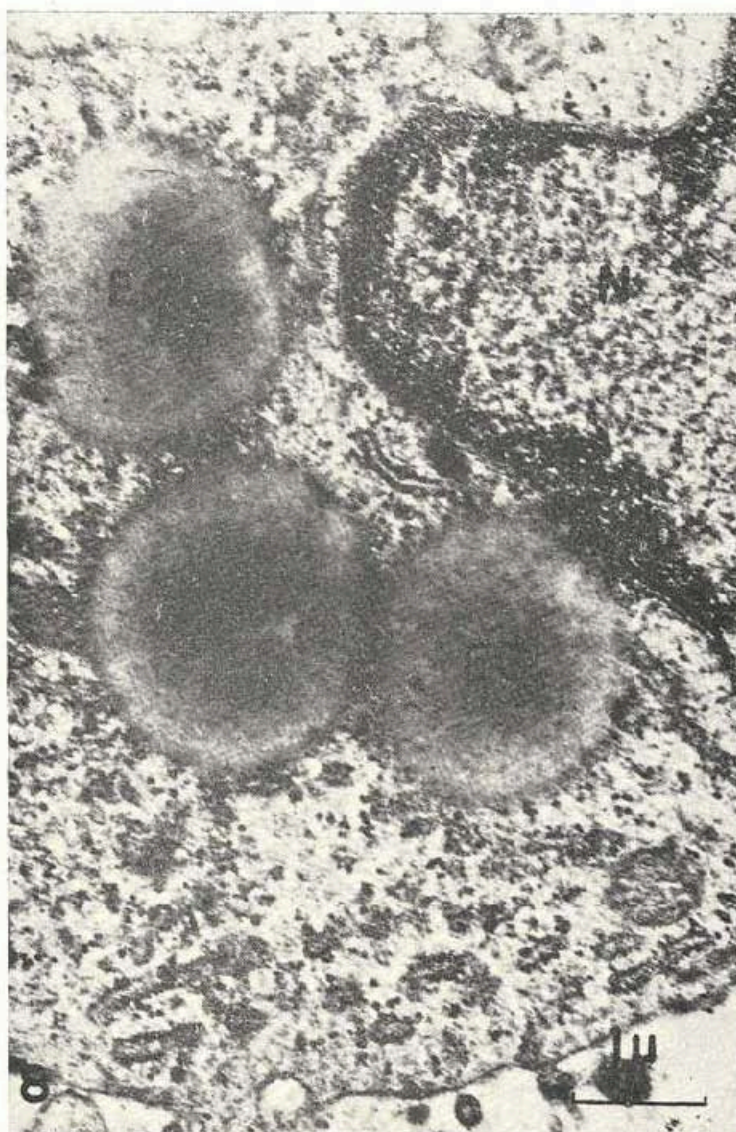


Fig. 8. Polimorfonuclear neutrófilo mostrando tres estructuras globulares rodeados por gránulos de glucógeno. Estos últimos se hallan dispersos en todo el citoplasma. En la parte superior derecha de la figura se observa parte del núcleo (N). Magnificación: 20.000 X.



Fig. 9. Microfotografía electrónica mostrando la presencia de material de aspecto fibrinoide (MF) en la vecindad de un polimorfonuclear. Restos de este material se hallan en contacto con la membrana celular, probablemente en vías de ser fagocitado. En la parte inferior derecha se observa un segmento de la prolongación pseudopódica (S). El polimorfonuclear muestra una vacuola fagocítica con material de aspecto fibrinoide (VF). La flecha señala los gránulos de glucógeno. Magnificación: 35.000 X.



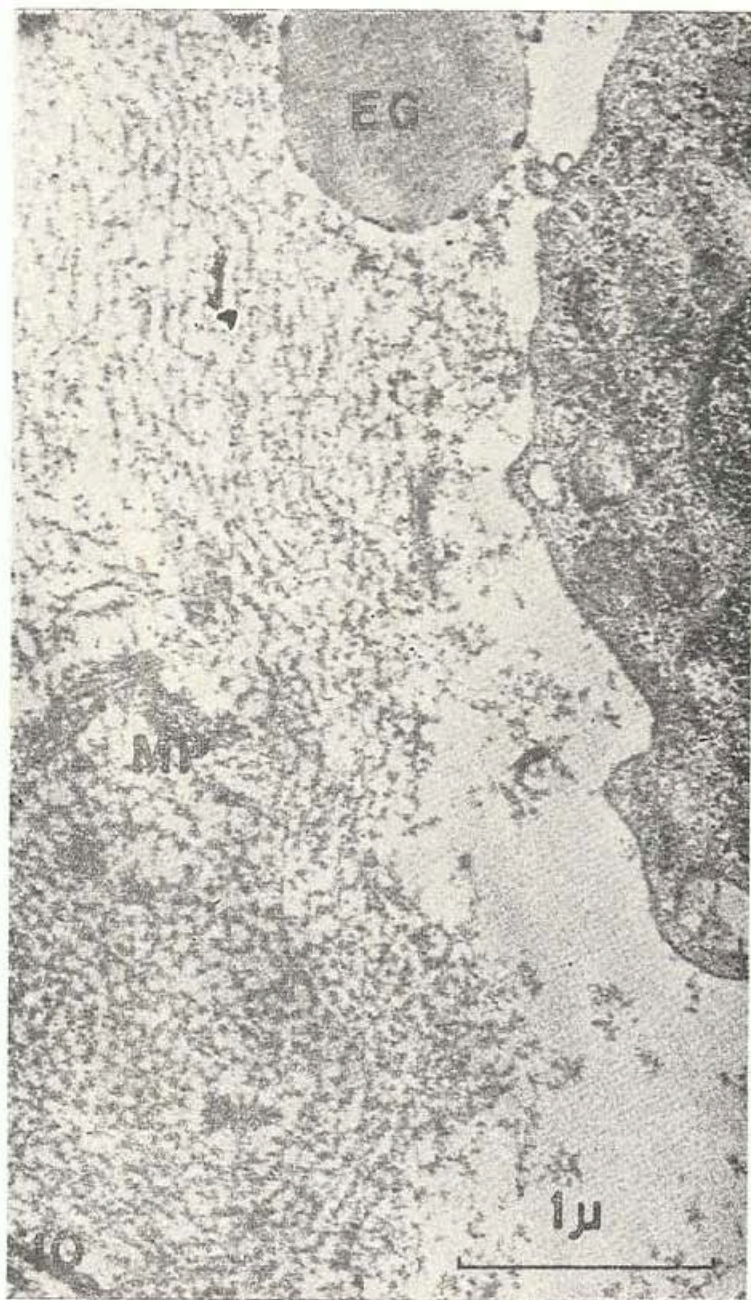


Fig. 10. Microfotografía electrónica mostrando el contenido extracelular del líquido sinovial. Se observa el material formado por partículas de moderada densidad electrónica (MP). En la parte superior de la figura se observa una estructura globular (EG) resultante de la lisis leucocitaria. Magnificación: 38.000 X.

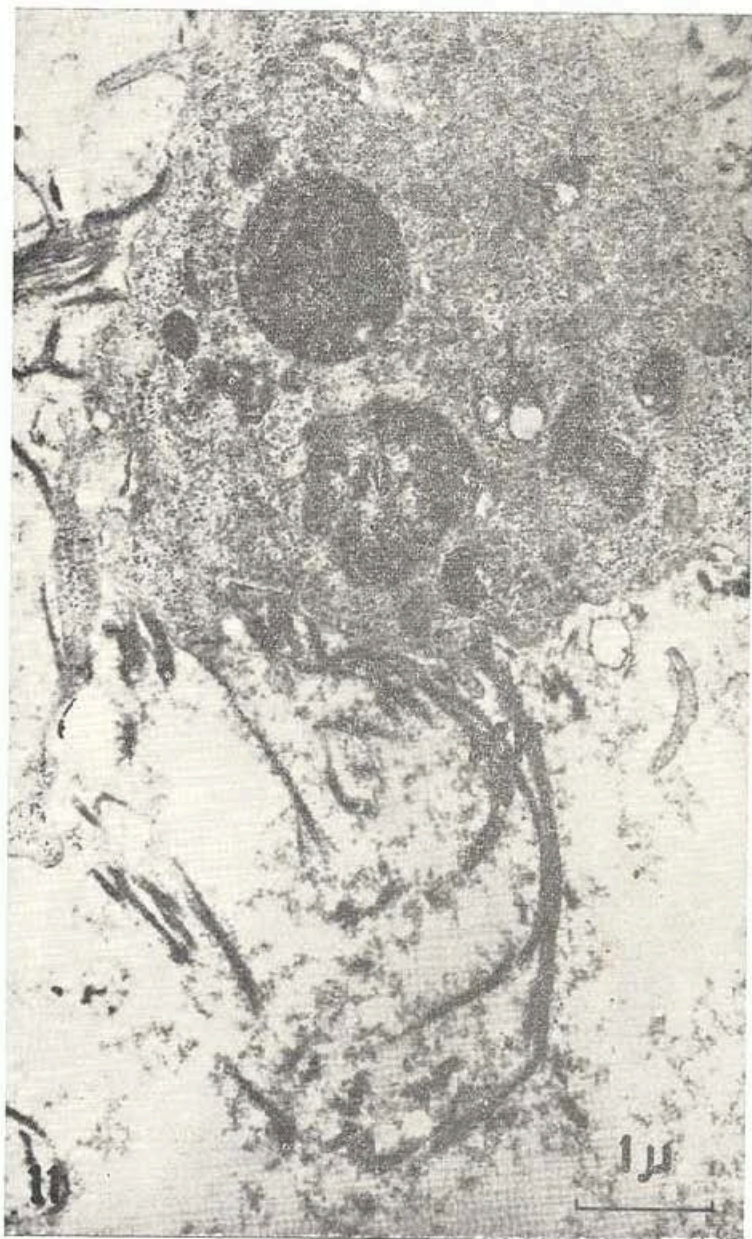


Fig. 11. Microfotografía electrónica mostrando la fagocitosis del material fibrinoide (MF), por un polimorfonuclear. Este último muestra en su citoplasma un cuerpo de inclusión (CI), parte de las lobulaciones nucleares (N), y lisosomas vacuolizados (L). Magnificación: 20.000 X.



plasmático rugosa y acumulado posteriormente en los canalículos; halazgo éste que es frecuente en la célula plasmática.

Se observaron lisosomas vacuolizados dentro y fuera de las células, lo que está relacionado con el hecho de que la fagocitosis, según algunos<sup>15</sup>, produce la destrucción de lisosomas con liberación y activación de enzimas lisosomales tales como las fosfatasas ácidas y las catepsinas<sup>1</sup>; lo que origina formación de anticuerpos antinucleares, que al combinarse con la macroglobulina (FR) y el antígeno globulínico, establece el círculo vicioso que mantiene el proceso inflamatorio crónico presente en la artritis reumatoidea. También se han reportado niveles altos de fosfatasas ácidas en el líquido sinovial<sup>14</sup>.

Barland, Novikoff y Hamerman<sup>2</sup> han observado acumulación de lisosomas alterados en la membrana sinovial en artritis reumatoidea.

La presencia de abundantes cuerpos de inclusión densos, vacuolas fagocíticas y fagosomas, observados en este estudio, parecen corresponder a las inclusiones citoplasmáticas descritas por Hollander<sup>8</sup>, las cuales fueron consideradas como la fagocitosis de un precipitado que contiene el factor reumatoideo. Posteriormente, Astorga y Bollet<sup>1</sup> demostraron positividad en las inclusiones de los leucocitos del líquido sinovial, en el 94% de los pacientes con artritis reumatoidea; señalando que las inclusiones, aparentemente, consisten de un precipitado fagocitado, que contiene el factor reumatoideo.

Las estructuras globulares observadas por nosotros, son similares a las ya descritas por Zucker-Franklin<sup>15</sup>. Según este autor dichas estructuras, presentes también en condiciones normales, pudieran representar un hialuronato viscoso o un producto de secreción de las células beta de la membrana sinovial. La naturaleza exacta de estas estructuras es desconocida. Se requiere un estudio histoquímico para dilucidar su naturaleza. Estas estructuras parecen estar aumentadas en los leucocitos del líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoidea. Se requiere un estudio para corroborar esta hipótesis.

El material proteináceo observado en el medio extracelular pudiera corresponder a ribonucleoproteínas. Pekin y colaboradores<sup>11</sup> han demostrado la presencia de DNA dentro y fuera de



Fig. 12. Polimorfonuclear mostrando la fagocitosis del material de aspecto proteináceo mediante dos prolongaciones pseudopódicas extremadamente alargadas. La membrana plasmática muestra invaginaciones superficiales. Magnificación: 22.000 X.



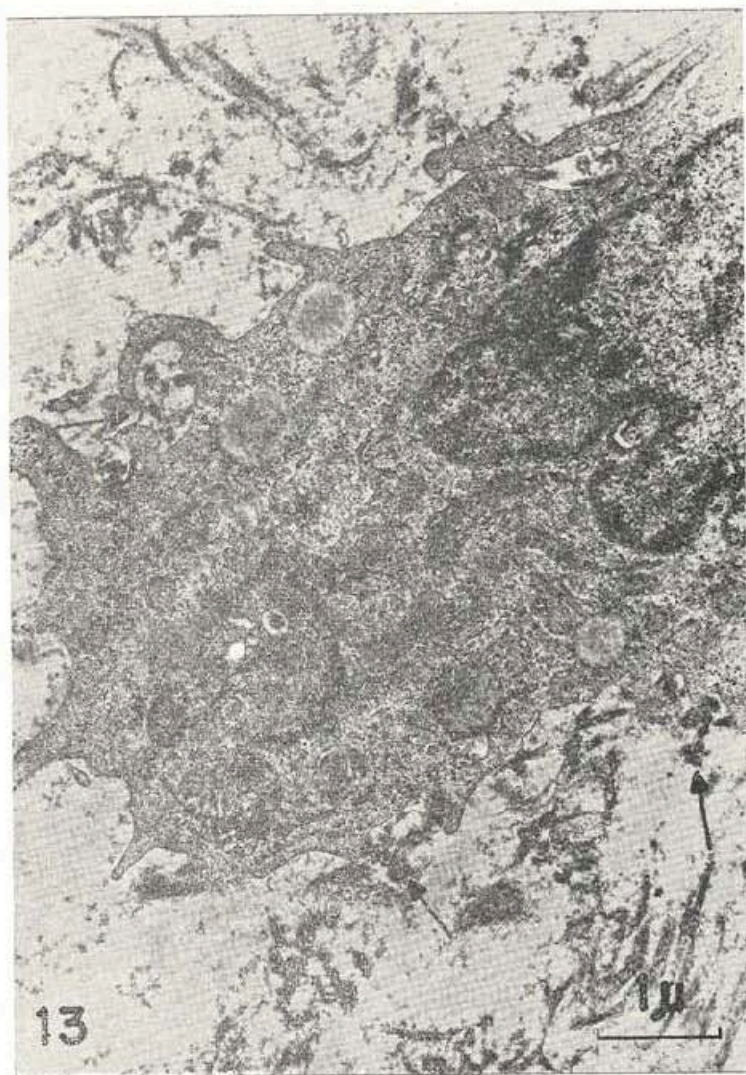


Fig. 13. Polimorfonuclear mostrando la fagocitosis del material de aspecto fibrinoide y proteináceo del contenido extracelular (flechas). Magnificación: 18.000 X.



Fig. 14. Microfotografía electrónica mostrando un polimorfonuclear con sus prolongaciones pseudopédicas englobando el material de aspecto proteináceo del líquido sinovial. El citoplasma muestra una vacuola fagocítica (VF). Magnificación: 22.000 X.



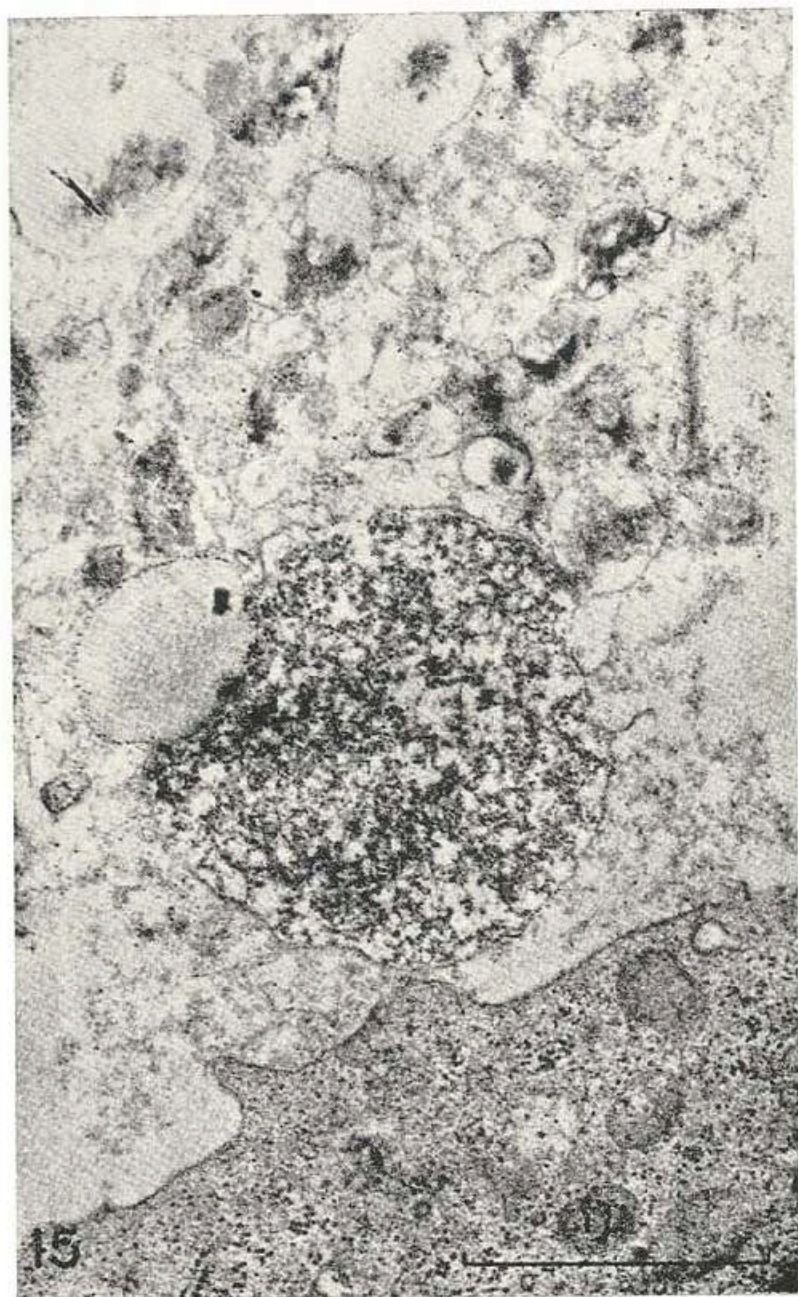


Fig. 15. Material extracelular constituido por particulas finas y densas y rodeado por una unidad de membrana. En su vecindad se observan fragmentos de membrana y vacuolas de contenido granular denso. Magnificación: 42.000 X.

las células, en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea. Este material también corresponde a los anticuerpos antinucleares presentes en el líquido sinovial<sup>4</sup> o a proteínas de alto peso molecular tales como beta-2 macroglobulina, alfa-2 macroglobulina, beta-1 lipoproteínas<sup>13</sup>, fracciones que se encuentran aumentadas en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea. Pudiera también representar el complejo resultante de la interacción entre las partículas de DNA y anticuerpos antinucleares o bien al factor reumatoideo.

El material fibrinoide pudiera corresponder a un producto de degradación del fibrinógeno (fracción beta-2 F) descrito por Schur<sup>13</sup>. Este material ha sido observado también por Norton y Ziff<sup>9</sup> en los espacios extracelulares de la membrana sinovial.

La presencia de organelos e inclusiones en el espacio extracelular, tales como los lisosomas y las estructuras globulares, pudiera ser el resultado de la lisis de las células tipo A de la membrana sinovial<sup>3</sup> o de los leucocitos degenerados presentes en el líquido sinovial.

## RESUMEN

Se estudiaron las alteraciones de la estructura fina de los leucocitos del líquido sinovial en un paciente con artritis reumatoidea. El líquido sinovial fue fijado primeramente en solución de glutaraldehído, fijado luego en tetraóxido de osmio e incluido en Epón. Las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron en el microscopio electrónico. Los leucocitos polimorfonucleares mostraron canalículos del retículo endoplasmático rugoso los cuales contienen un material de mayor densidad electrónica que el de la matriz del hialoplasma. Se observaron fagosomas, vacuolas fagocíticas, estructuras globulares y cuerpos de inclusión densos. No se observó alteración del núcleo. El contenido extracelular está representado por un material de aspecto proteináceo, fragmentos de membrana celular, vacuolas de contenido granular y material fibrinoide. Se observó una actividad fagocítica intensa de los elementos estructurales presentes en el contenido extracelular. Se discute la probable naturaleza de los elementos estructurales presentes en los



leucocitos y en el contenido extracelular, de acuerdo con los hallazgos de otros autores.

## SUMMARY

The alterations on the fine structure of fluid sinovial leukocytes in a patient affected with rheumatoid arthritis were studied. The sinovial fluid was primarily fixed in glutaraldehyde solution, post-fixed in osmium tetroxide and embedded in Epon. Thin sections stained with uranyl acetate were observed with the electron microscope. The polymorphonuclear leukocytes show endoplasmic reticulum canaliculi containing an homogenous material more electron dense than that observed in the hyaloplasm. The presence of phagosomes, phagocytic vacuoles, globular structures and dense inclusion bodies were observed. No alteration of the nucleus was found. The extracellular containing is represented by a proteinaceous granular material, cellular membrane fragments, granulated vacuoles and fibrinoid material. An intense phagocytic activity of these structural elements was observed. The probable significance of these findings and their relationship with the pathogenesis of rheumatoid arthritis is discussed.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — ASTORGA, G.; BOLLET, A. "Diagnostic specificity and possible pathogenetic significance of inclusion in synovial leukocytes". *Arthritis Rheum.* 8:511-23. 1965.
- 2 — BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. "Electron microscopy of the human synovial membrane". *J. Cell Biol.* 14:207-209. 1962.
- 3 — BARLAND, P.; NOVIKOFF, A. B.; HAMERMAN, D. "Fine structure and cytochemistry of the rheumatoid synovial membrane with special reference to lysosomes". *Amer. J. Path.* 44:853-859. 1964.
- 4 — BARNETT, E. V.; BIENENSTOCK, J.; BLOCH, J.; K. J. "Antinuclear factors in synovial fluid: possible participants in the rheumatoid inclusion body". *Arthritis Rheum.* 8:289-297. 1965.
- 5 — DELBARRE, F.; KAHAN, A.; AMOR, B.; KRASSINE, G. "Le ragocyte synovial son intérêt pour le diagnostic des maladies rhumatismales". *Presse Medicale.* 72:2129-2131. 1964.

- 6 — GORDIN, R. "Toxic granulation in leukocytes". *Acta Med. Scand. (Suppl.)* 143:270-284, 1952.
- 7 — HADEN, R. L. "Quantitative changes in neutrophilic leukocytes". *Amer. J. Clin. Path.* 5:354-363, 1935.
- 8 — HOLLANDER, J. L.; McCARTY, D. J.; ASTORGA, G.; CASTRO MURILLO, E. "Studies on the pathogenesis of rheumatoid joint inflammation". *Ann. Inter. Med.* 62:271, 1965.
- 9 — NORTON, W. L.; ZIFF, M. "Electron microscopic observations on the rheumatoid synovial membrane". *Arthritis Rheum.* 9:589-609, 1966.
- 10 — PARKER, R. L.; SCHMID, F. R. "Phagocytosis of particulate complexes of gamma globulin and rheumatoid factors". *J. Immunol.* 88:519-525, 1962.
- 11 — PEKIN THOMAS, J., Jr.; THEODORE, I. MALININ and NATHAN, J. "The clinical significance of deoxyribonucleic acid particles in synovial fluid". *Annals Int. Med.* 65:1229-1235, 1966.
- 12 — PONDER, E.; PONDER, R. V. O. "The cytology of the polymorphonuclear leukocyte in toxic conditions". *J. Lab. Clin. Med.* 28:316-330, 1942.
- 13 — SCHUR, P. H.; SANDSON, J. "Immunologic studies of the proteins of human synovial fluid". *Arthritis Rheum.* 6:115-127, 1963.
- 14 — SMITH, C.; HAMERMAN, D. "Acid phosphatase in human synovial fluid". *Arthritis Rheum.* 5:411-419, 1962.
- 15 — ZUCKER-FRANKLIN, D. "The phagosomes in rheumatoid synovial fluid leukocytes: A light, fluorescence, and electron microscope study". *Arthritis Rheum.* 9:24-36, 1966.
- 16 — ZVAIFLER, N. J. "A speculation on the pathogenesis of joint inflammation in rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum.* 8:289-292, 1965.

---

"Cabe llamar la atención de aquellos a quienes compete este asunto en el sentido de que es indispensable ir desde ya creando una conciencia en cuanto a lo que implica la gran responsabilidad de ser científico, es decir, que la carrera científica no sea una forma más de ganarse la vida y se constituya en un instrumento de progreso al servicio de la humanidad".

Ernesto Medina  
"Acta Científica Venezolana"



“Los jóvenes investigadores deben ser intransigentes y tenaces en el señalamiento de las fallas organizativas, técnicas y formativas que obstaculizan el normal y eficaz desarrollo de la actividad científica. Esforzarse por imponer las soluciones correspondientes, mediante una actitud de trabajo serio y consecuente, planificado e intenso, con un espíritu constante de superación para que sea fecundo. Un trabajo impregnado de mística y vocación verdadera.

El esfuerzo del científico por su trabajo ha de manifestarse en cualesquiera condiciones. No debe sentirse abrumado por las dificultades, ni mucho menos utilizarlas como justificación para la inactividad en la investigación. Ha de trabajar sobre las bases existentes; utilizar el ingenio para obtener resultados positivos y, avalado por este hecho, adoptar una actitud beligerante por la justipreciación del trabajo científico. Luchar porque se tome conciencia de la importancia de la Ciencia en el desarrollo ordenado y racional del País. Lograr, en fin, que el trabajo científico en Venezuela se enrumbe correctamente”.

Ernesto Medina

*“Acta Científica Venezolana”*