

Investigación original

Estudio comparativo de la fase temprana de artritis experimental en 3 modelos de ratas



Emilio De Simone^a, Yael Lastra^a, Nicolás Caggiano^a, Julieta Díaz^a,
Flores Rubatino^a, Araceli Ferretto^a, Verónica De Luca Sarobe^a, Federico Gullace^b,
Elisabet Ritacco^c y Angelina Chiappe Barbará^{a,*}

^a Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^b Bioterio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^c Endodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de junio de 2016

Aceptado el 24 de octubre de 2016

On-line el 22 de febrero de 2017

Palabras clave:

Osteoartritis

Modelo animal

Rata

Inflamación

Citoquinas

Metaloproteasas de matriz

R E S U M E N

Objetivo: Comparar y caracterizar modelos de osteoartritis inducida en ratas en una fase temprana (7 días luego de la inducción).

Materiales y métodos: Este es un estudio retrospectivo que compara resultados de experiencias previas. Se compararon los modelos de: a) corte del ligamento cruzado anterior (CLX), y artritis inducida por adyuvante en sus 2 variedades, b) subplantar (ASP) y c) intraarticular (AIA). Las variables analizadas fueron: estado clínico, histología, radiología y marcadores séricos de inflamación (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , MMP-2 y MMP-9).

Resultados: El modelo AIA presenta diferencias significativas en diversos parámetros cuando se compara con el grupo control. Además, los niveles de IL-1 fueron elevados en todos los modelos de osteoartritis respecto al basal, siendo más pronunciados en los grupos CLX y AIA ($p < 0,001$). Por otra parte, el valor más bajo de IL-4 fue observado en el grupo AIA ($p < 0,001$ frente al grupo basal). Además, los valores más elevados de MMP-2 fueron observados en el modelo ASP.

Conclusiones: Si bien se usan y se comparan de manera indistinta los modelos de artritis en ratas como si fueran similares, en este trabajo demostramos que en un estadio temprano los modelos se comportan bastante diferentes en la mayoría de las variables estudiadas.

© 2017 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U.

Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mach@fvet.uba.ar (A. Chiappe Barbará).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.10.007>

0121-8123/© 2017 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

A comparative study of early stage arthritis in three experimental rat models

A B S T R A C T

Keywords:

Osteoarthritis
Animal models
Rat
Inflammation
Cytokines
Matrix metalloproteinases

Objective: To assess osteoarthritis in rat models at an early stage (7 days after induction).

Materials and methods: This is a retrospective study comparing results from previous experiments. The models compared were: a) anterior cruciate ligament transection model (CLX), and an adjuvant-induced arthritis model in two varieties b) sub-plantar (ASP), and c) intra-articular (AIA). Seven days after osteoarthritis (OA) induction, an analysis was made of the clinical, histological, radiological, and serological inflammatory markers (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , MMP-2, and MMP-9).

Results: The AIA model produced significant differences in several parameters, when compared to the control group. However, the levels of IL-1 were higher in all OA models than in the baseline group, being more pronounced in the CXL and AIA groups ($P < .001$). Surprisingly, the lowest value for IL-4 was observed in the AIA group ($P < .001$ versus baseline group). Furthermore, the most elevated values of MMP-2 were observed in the ASP model.

Conclusions: Although arthritis rat models are used and compared interchangeably as if they were the same, it is shown in this work that at an early stage the models behave quite different in most of the studied variables.

© 2017 Asociación Colombiana de Reumatología. Published by Elsevier España, S.L.U.

All rights reserved.

Introducción

Las artritis en sus diversas presentaciones nosológicas son enfermedades que presentan un curso progresivo, con algunos periodos de remisión, causan dolor y suelen dejar secuelas. En medicina humana la artritis reumatoide es de particular importancia por su incidencia, mientras que en medicina veterinaria los equinos deportivos presentan artritis de curso crónico y progresivo con reagudizaciones esporádicas, en general por sobrecarga mecánica relacionada con la actividad deportiva. El manejo adecuado de la osteoartritis (OA) permitiría reducir las altas pérdidas económicas ocasionadas por el retiro temprano de animales de la competencia deportiva.

Tanto para el estudio de la artritis en humanos como en equinos se ha trabajado desde hace tiempo con modelos murinos de artritis, con el propósito de comprender la fisiopatología de la enfermedad y de evaluar la utilidad de drogas antiartríticas. Sin embargo, existen varios modelos de artritis en ratas que guardan relación con las enfermedades estudiadas en humanos y otras especies, pero los mismos no han sido bien caracterizados desde el punto de vista de la respuesta temprana en sus aspectos clínicos, histológicos, radiológicos, así como tampoco en cuanto a su perfil sérico inflamatorio. Considerando las normas correspondientes al uso racional de animales de laboratorio¹, surgió la posibilidad de comparar retrospectivamente los resultados de distintas experiencias realizadas en nuestro laboratorio basadas en el uso de algunos de los modelos propuestos para el estudio de la artritis.

En este trabajo comparamos 3 modelos murinos, que si bien están ampliamente difundidos en artritis experimental no se ha aclarado previamente cuál es el tipo de artritis que cada uno de ellos mejor representa, así como tampoco ha sido notificado cuáles son los métodos complementarios más pertinentes para el estudio de cada una de estas artritis.

Es decir, por un lado estos modelos han sido usados, indistintamente, tanto para evaluar fenómenos agudos como crónicos, y en cuanto a la determinación de marcadores moleculares de la inflamación hay contrariedades en la información para cada modelo. Actualmente, el rol que cumplirían los biomarcadores en la OA resulta incierto, y esto es en gran parte debido a la diversidad de modelos de artritis que se han estado utilizando. La validación y utilización biológica de los biomarcadores moleculares podría resultar de suma utilidad para la práctica clínica en el diagnóstico y monitorización de la OA, siempre y cuando se conozca cómo varían los niveles de estos biomarcadores según las distintas presentaciones de la OA y cómo se asocian los niveles de ellos entre sí.

En este trabajo comparamos 3 modelos que hemos utilizado, estos son: el de sección de ligamentos cruzados (CLX) y el de artritis inducida por adyuvante en 2 modalidades, intra-articular (AIA) y subplantar (ASP).

El modelo de CLX supondría un tipo de artritis crónica producido por el desgaste de las carillas articulares como consecuencia de la inestabilidad producida en la articulación injuriada; este modelo podría corresponderse con un buen modelo del desgaste deportivo por sobreentrenamiento.

Por otra parte, la artritis inducida por adyuvante ha sido un modelo ampliamente utilizado para inducir la patogenia de la artritis reumatoide², así mismo, este modelo puede ser utilizado para asemejar otros tipos de artritis reactivas que suelen ser muy frecuentes en medicina veterinaria. La artritis puede ser fácilmente inducida por inoculación subcutánea de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Mtb) inactivada por calor y suspendida en excipiente oleoso. Por otra parte, el modelo de artritis inducida por adyuvante se ha estado utilizando como modelo general de inflamación para permitir evaluar el uso de antiinflamatorios. Cabe mencionar que por factores genéticos³ no todas las cepas de ratas son factibles de ser inducidas, sin embargo, funciona bien en Sprague-Dawley⁴ y

Lewis⁵. Algunos de los factores estudiados a los que se les atribuye la susceptibilidad de estas cepas para generar la artritis inducida por adyuvante serían el incremento en la expresión de la hsp47 articular con el incremento de colágeno tipo I y el desarrollo de anticuerpos anti-hsp47⁶, así como también la migración de leucocitos hacia la articulación y el rol del factor quimiotáctico MCP-1⁷. Este modelo general de inflamación ha sido utilizado para evaluar el efecto antiartrítico de diferentes drogas⁸.

Ciertos autores en sus trabajos han administrado el adyuvante para inducir la artritis por vía intraarticular en la rodilla y evalúan la respuesta a los 3 y 5 días posadministración⁹.

En nuestro trabajo decidimos comparar la experiencia del uso de estas 2 vías de adyuvante, ya que la diferente forma de aplicación parecería generar efectos diversos. Si bien la administración de adyuvante produce un modelo de artritis que se asemeja a la artritis reumatoide, este modelo también resulta válido para otros tipos de artritis que se dan en medicina veterinaria, siendo que este modelo se caracteriza por presentar un buen componente inflamatorio y un importante daño del cartílago articular¹⁰. Por el contrario, el modelo de CLX ha sido usado para simular una evolución más crónica de la OA¹¹. Si bien existen trabajos publicados con diferentes modelos¹², la caracterización y comparación propiamente dicha del modelo utilizado respecto a otros resulta dificultosa porque los diferentes tiempos, drogas y variables aplicadas no se mantienen constantes en todos los trabajos.

En virtud de nuestro interés de medir mediadores moleculares de inflamación como citoquinas y MMP, en la bibliografía existen resultados contrapuestos probablemente por los diferentes modelos y tiempos de muestreos. El objetivo de este trabajo es caracterizar y comparar patrones relacionados con la sintomatología clínica, radiológica e histopatológica, así como también el estudio de biomarcadores moleculares inflamatorios en ratas que presentaban diferentes modelos de artritis en una etapa temprana de los mismos (7 días).

Materiales y métodos

Diseño experimental y animales. En este trabajo se comparan resultados de experiencias previas de nuestro grupo; se tomó como día de referencia el día 7, ya que fue el día más representativo para todos los modelos. Se utilizaron 40 ratas Sprague Dolley de 2 meses (200-250 g) criadas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (10 animales por grupo). Todos los animales fueron mantenidos a 22 °C con ciclos de luz de 12 h, con acceso a comida y agua ad libitum. Los grupos fueron: i) basal o baseline, animales a los cuales no se les realizó ningún procedimiento; ii) sección de ligamento cruzado anterior (CLX), este grupo se realizó mediante un procedimiento quirúrgico con anestesia ketamina/xilacina¹¹; iii) artritis inducida por adyuvante subplantar (ASP), a este grupo se le inoculó 0,1 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma, St Louis, EE. UU.) por vía subplantar¹³, y iv) artritis inducida por adyuvante intraarticular (AIA), a este grupo se le inoculó 0,1 ml de adyuvante completo de Freund por vía intraarticular en la articulación femorotibiorrotuliana¹⁴.

De cada grupo de 10 animales, al sacrificio, 5 animales se utilizaron para estudios radiológicos e histopatológicos y los otros 5 para medir biomarcadores inflamatorios a partir de homogenatos articulares. Los animales fueron sacrificados por sangrado a blanco, bajo anestesia general de ketamina-xilacina. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Puntaje clínico. Se definió un puntaje de 0 a 4¹⁵ según el grado de gravedad de la claudicación: 0 representa ausencia de claudicación; 1: claudicación apenas perceptible; 2: claudicación moderada; 3: claudicación muy marcada en la que en ocasiones el animal sustrae al apoyo el miembro, y 4: se presenta con sustracción al apoyo la mayor parte del tiempo. La observación de los síntomas se realizó diariamente.

Puntaje histopatológico. Una vez finalizada la experiencia se procedió a la eutanasia de las ratas y se extrajeron las articulaciones: tibiotarsiana y femorotibiorrotuliana, para evaluación histopatológica. Las muestras se fijaron en formol al 10% y se realizó un proceso estándar de descalcificación para muestras óseas. Los cortes se tiñeron con hematoxilina/eosina. Las muestras observadas se clasificaron de 0 a 6 según el grado de infiltración celular y resorción ósea del hueso subyacente según el puntaje de Pritzker^{12,16}.

Estudios radiográficos. Se realizaron estudios radiográficos con equipo de rayos X con radiovisógrafo digital (Kodak), especial para muestras de animales de laboratorio. Se radiografiaron las articulaciones femorotibiorrotuliana y tibiotarsiana. Las placas se analizaron mediante puntaje radiográfico, de acuerdo con lo descrito previamente por otros autores¹⁷, con ligeras modificaciones. Brevemente, estrechamiento del espacio articular (0-3) y daño del contorno articular (0-3), siendo el rango total de 0 a 6.

Zimografías. La actividad de MMP-2 y MMP-9 se analizó mediante zimografía en geles de poliacrilamida con el agregado de gelatina. La muestra consistió en lisados articulares que se realizaron disecando la articulación femorotibiorrotuliana para trituración en homogeneizador; las muestras se recuperaron en buffer de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100), 1 ml/g de tejido. Al producto obtenido se le determinó la concentración de proteínas utilizando un kit comercial (Wiener Lab.; Argentina). Alícuotas de 100 µg se mezclaron con el buffer muestra y se calentaron por 3 minutos a 100 °C, posteriormente se sembraron en el SDS-PAGE 10% con 0,2% de gelatina. Luego los geles fueron lavados con 50 mM Tris-HCl pH 7,5 con el agregado de 2,5% de Triton X-100 durante 45 min, seguido de lavado con 50 mM Tris HCl 5 mM CaCl 1 µM ZnCl₂ pH 7,5 con el agregado de 2,5% de Triton X-100 pH 7,5 durante 45 min. A continuación, se incubaron con 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 200 mM NaCl pH 7,5 a 37 °C por 24 h. Finalmente, se tiñeron con 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 por 2 h y posteriormente fueron desteñidos con solución decolorante (25%v/v isopropanol 10%v/v ácido acético). La actividad gelatinolítica generó bandas claras, los geles fueron digitalizados y se realizó un estudio densitométrico de las bandas por medio del software J Image. La actividad zimográfica fue expresada como porcentaje respecto al grupo basal para la MMP-2 y como porcentaje respecto a la muestra control en el caso de la MMP-9. La explicación

Tabla 1 – Valores de los resultados de las diferentes variables estudiadas para cada modelo. Se aplicó ANOVA seguido del test de Tukey

	Al día 7	Basal	CLX	AIA	ASP	
Score clínico		0,14 ± 0,08	0	4,0 ± 0,7	2,5 ± 0,13	p < 0,001 AIA y ASP vs. basal y CLX
Int. conf. 95%		0,08-0,19		3,49-4,51	2,41-2,59	p < 0,01 AIA vs. ASP
Score histopatológico		0,11 ± 0,25	0,25 ± 0,05	4,6 ± 0,54	0,83 ± 0,33	p < 0,001 AIA vs. basal, CLX y ASP
Int. conf. 95%		0,07-0,29	0,21-0,29	4,11-4,87	0,59-1,07	
RX		0,14 ± 0,03	0,19 ± 0,12	4,5 ± 0,52	0,5 ± 0,16	p < 0,001 AIA vs. ASP, CXL y basal
Int. conf. 95%		0,12-0,16	0,10-0,28	4,13-4,87	0,39-0,61	
IL-6		107,66 ± 24,38	226,8 ± 35,78	179 ± 38,06	270 ± 65,14	p < 0,001 AIA, ASP y CLX vs. basal
Int. conf. 95%		90,22-125,10	201,21-252,39	152,16-206,61	223,40-316,60	
IL-4		9,16 ± 1,51	7,54 ± 2,77	3,05 ± 1,51	9,4 ± 3,3	p < 0,001 AIA vs. ASP y basal
Int. conf. 95%		8,08-10,24	5,56-9,52	1,97-4,13	7,04-11,76	p < 0,01 AIA vs. CXL
IL-1β		118,52 ± 22,93	275,1 ± 136,93	189,97 ± 43,78	170,29 ± 23,88	p < 0,001 AIA y CXL vs. basal
Int. conf. 95%		102,12-134,92	177,15-373,05	158,65-221,29	153,21-187,37	p < 0,01 ASP vs. basal; p < 0,05 ASP vs. CLX
TNF-α		143,02 ± 15,64	112,5 ± 81,49	285,45 ± 96,93	141,51 ± 11,17	p < 0,001 AIA vs. ASP, CXL y basal
Int. conf. 95%		131,83-154,21	54,21-170,79	216,12-354,78	133,52-149,50	
MMP-2		100 ± 27,25	152,34 ± 106,21	123,30 ± 42,23	278,86 ± 12,55	p < 0,001 ASP vs. AIA, CXL y basal
Int. conf. 95%		80,69-119,31	76,37-228,31	93,09-153,51	269,88-287,84	
MMP-9		0,15 ± 0,05	0,19 ± 0,13	62,42 ± 17,62	23,29 ± 11,54	p < 0,001 AIA y ASP vs. basal y CLX
Int. conf. 95%		0,11-0,18	0,10-0,28	49,82-75,02	15,03-31,54	p < 0,01 AIA vs. ASP

de esta decisión es que debido a que la MMP-9 se encuentra prácticamente ausente en muestras del grupo basal hubo que referirla como porcentaje de la muestra control. La cantidad que se cargó de la muestra control fue previamente titulada de acuerdo con su actividad para producir un porcentaje de saturación en la zimografía del 50%. Los datos correspondientes a diferentes geles fueron normalizados mediante la utilización de esta muestra control, que además sirvió de referente para el análisis densitométrico.

ELISA de IL-1β, IL-4, IL-6 y TNF-α. La concentración de citoquinas (IL-1β, IL-4, IL-6, TNF-α) en los sobrenadantes de los lisados articulares, preparados al igual que lo descrito en el ítem anterior, fue determinada mediante ELISA de captura comercial BD OptEIA (BD, Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones se determinaron mediante curva patrón realizada con la respectiva citoquina recombinante suministrada por el kit. Se leyeron las muestras en lector de microplacas Rayto 2100 (China) a 450 nm.

Análisis estadísticos. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron utilizando el software Instat3. Se aplicó ANOVA para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales ($p \leq 0,05$) y luego el test de Tukey de comparaciones múltiples.

Resultados

La [tabla 1](#) resume los valores de los resultados obtenidos, que serán analizados a continuación en detalle.

Puntaje clínico. Se puede observar que los modelos de artritis que producen diferencias significativas en el puntaje clínico respecto al grupo basal son el de AIA y ASP ($p < 0,001$). Además, el modelo de AIA demostró ser clínicamente más agresivo que el de ASP ($p < 0,01$). Estos resultados estarían indicando que, para realizar estudios de evaluación de sintomatología clínica y respuestas a una droga, los modelos de ASP y AIA requieren menos tiempo que el modelo de CLX. Estos 2 modelos además de la claudicación observada demostraban

presentar en muchos casos deformación y edema del miembro ([fig. 1](#)).

Puntaje histopatológico. Mediante el puntaje histopatológico se puede observar que los 3 modelos presentan diferencias significativas respecto al basal, siendo el modelo de AIA el que más diferencia presenta ([fig. 2a](#) y [fig. 3](#)). De esta manera, la AIA genera una reacción inflamatoria de manera intensa al día 7, en tanto que los otros 2 modelos, ASP y CLX, desarrollan lesiones de manera menos intensa. Los modelos de CLX y ASP presentaban principalmente escasas zonas de fibrilación superficial de la estructura del cartílago. Por otra parte, el modelo de AIA presentaba fisuras en el cartílago articular con pérdida de la matriz del cartílago e hiperplasticidad ([fig. 3](#)).

Puntaje radiológico. En el puntaje radiológico se obtuvieron resultados similares a los observados con los modelos en la histopatología. El modelo de AIA mostró diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto al resto de los modelos ([fig. 2b](#) y [fig. 4](#)), siendo el modelo de AIA el que mayor daño radiológico presentó, mostrando severa pérdida de contorno articular y

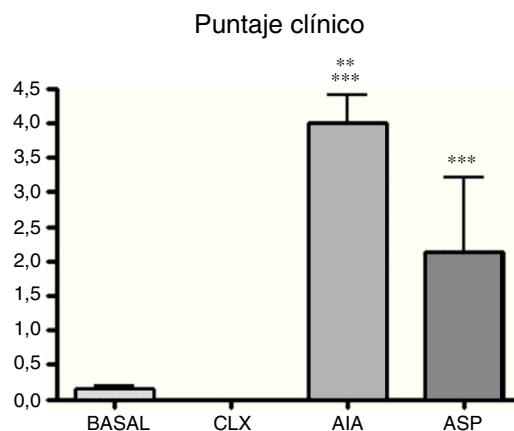


Figura 1 – Diferencias en la respuesta clínica en los distintos grupos cuantificada mediante el puntaje clínico. Se aplicó ANOVA seguido del test de Tukey. *p < 0,001 vs. grupos basal y CLX. **p < 0,01 vs. ASP.**

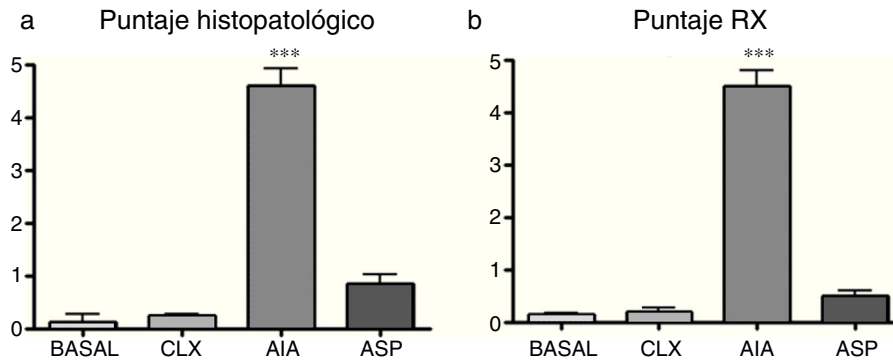


Figura 2 – a) Diferencias en los análisis histopatológicos entre los diferentes grupos cuantificados mediante un puntaje histológico. Se aplicó ANOVA seguido del test de Tukey. El grupo AIA presenta diferencias significativas (***) $p < 0,001$ vs. los 3 grupos restantes. b) Resultados del puntaje radiográfico en el cual se observa que el modelo que presenta mayores lesiones es el de AIA (***) $p < 0,01$ vs. el resto de los modelos).

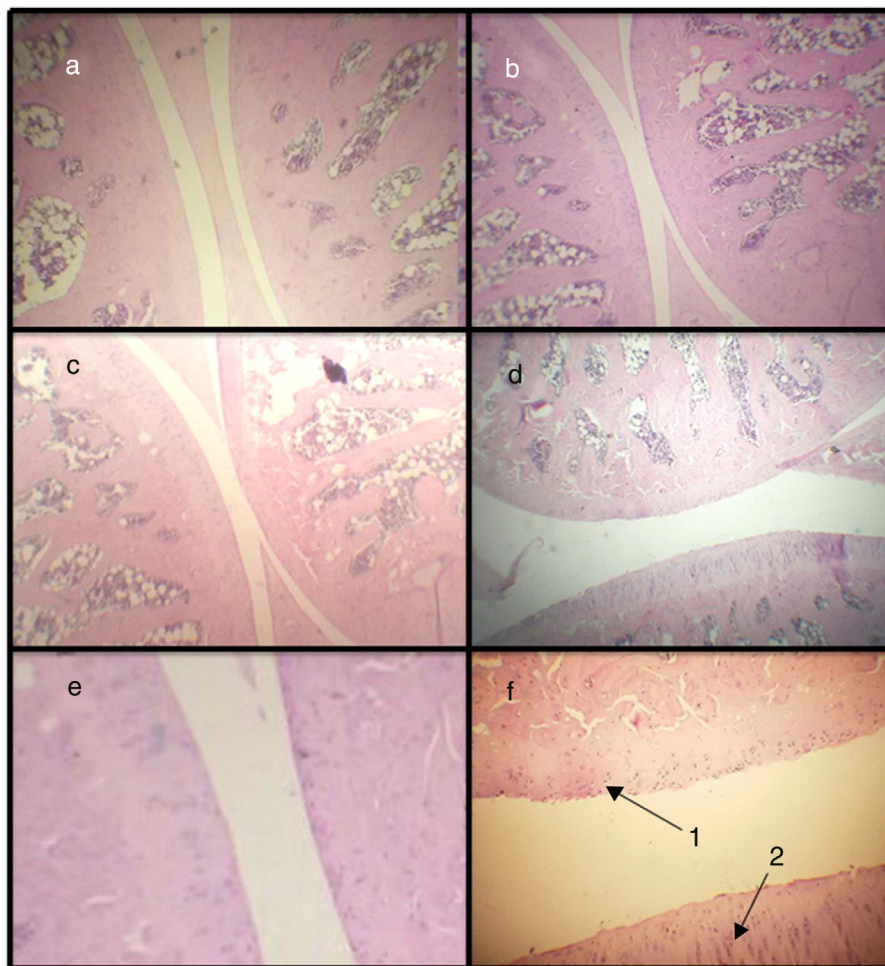


Figura 3 – Microfotografías de cortes histológicos correspondientes a la articulación femorotibrotrotuliana. Basal (a), CLX (b), ASP (c) y AIA (d) (100x). Los cortes (e) y (f) corresponden a ampliación de sección sana y con daño respectivamente (400x). La figura (d) es la que presenta daños en la superficie articular y se encuentra ampliada. En (f) se observa fibrilación articular (1) e hiper celularidad (2) a nivel del cartílago articular.



Figura 4 – Radiografías en posición anteroposterior de los miembros de cada grupo (basal, CLX, AIA, ASP). Las mayores lesiones las presentó el grupo ASP, donde se observa cierto grado de deformación, erosión ósea, periostitis, estrechamiento del espacio articular, osteopenia y pérdida del contorno óseo.

estrechez del espacio articular. Por otra parte, los modelos de ASP y CLX evidenciaron grados leves de deformación y de estrechez del espacio articular (fig. 4).

Zimografías. Los resultados zimográficos en SDS-PAGE con el agregado de gelatina mostraron 2 bandas correspondientes a la MMP-2 y MMP-9. De acuerdo con los estudios densitométricos referidos con las muestras patrones, pudimos observar que los niveles de MMP-2 estaban muy elevados en el modelo de ASP, siendo el único que presentaba diferencias significativas respecto al basal ($p < 0,01$) (fig. 5). Asimismo, al analizar la MMP-9 observamos que estaba incrementada en los 2 modelos de artritis inducida por adyuvante (ASP y AIA), siendo que la MMP-9 se incrementa a nivel articular exclusivamente en procesos patológicos. Se destaca que el modelo de CLX al día 7 no presenta niveles elevados de MMP-9 (fig. 5).

ELISA de citoquinas. Las citoquinas presentaron resultados variables entre ellas y según el modelo en cuestión. Respecto a la IL-1 β , si bien todos los modelos tuvieron incrementos respecto al basal, los modelos de CLX y AIA fueron los que mostraron las diferencias con mayor nivel de significación ($p < 0,001$), aunque el modelo ASP también presentó diferencia significativa respecto al basal ($p < 0,01$). Por otra parte, la IL-4, que es una citoquina relacionada con perfil de respuesta TH₂ y antiinflamatoria, mostró en el modelo de AIA una caída importante respecto al grupo basal y al grupo ASP ($p < 0,001$); también el modelo AIA presentó diferencia significativa respecto al modelo CLX, aunque con una significación menor ($p < 0,01$). Además la IL-6 tuvo incrementos en los 3 modelos, siendo más notables en los modelos de ASP y CLX ($p < 0,001$) vs. basal. Por último, el TNF- α mostró un incremento significativo

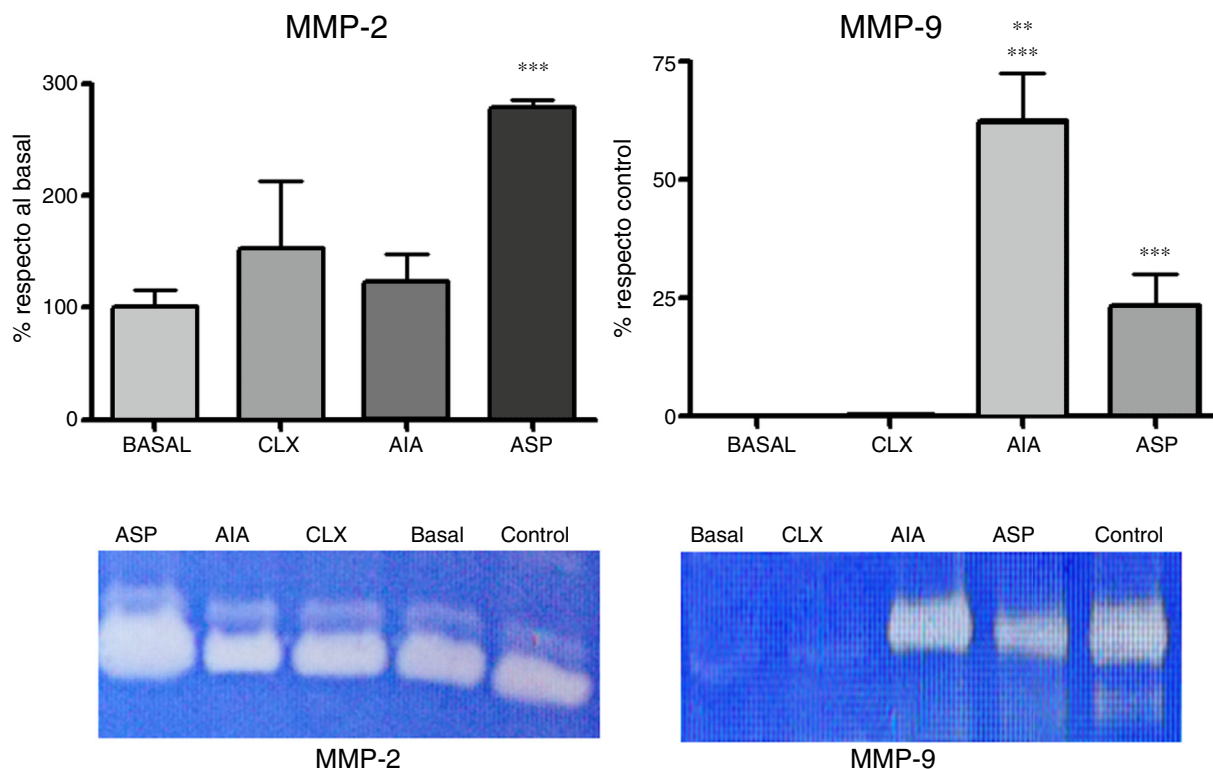


Figura 5 – Expresión de MMP-2 y MMP-9 a partir de homogenatos articulares para cada uno de los modelos, el control corresponde a una muestra de MMP-2 y MMP-9, respectivamente, que se utiliza para ubicar las bandas y referir la densitometría de diferentes geles. La MMP-2 se expresó como porcentaje de actividad respecto al grupo basal. La MMP-9 fue expresada como porcentaje de actividad respecto a la muestra control. Se aplicó ANOVA seguido del test de Tukey. Para la MMP-2: * $p < 0,001$ ASP vs. AIA, CXL y basal. Para MMP-9: *** $p < 0,001$ AIA y ASP vs. basal y CLX, ** $p < 0,01$ AIA vs. ASP.**

solo en el modelo de AIA vs. los otros 3 modelos ($p < 0,001$) (fig. 6).

Discusión

En este trabajo, al comparar los resultados en diferentes modelos de artritis inducida, podemos observar que si bien en la bibliografía los modelos se usan de manera indistinta para probar diferentes fármacos o evaluar la respuesta a los mismos, debería ser contemplada la diferencia en la manifestación clínica que ellos inducen. En nuestro trabajo hicimos foco en la fase temprana de la OA que correspondería a un modelo de fase aguda. Como podemos observar en la tabla 1, solo los modelos de artritis inducida por adyuvante presentan una sintomatología clínica al día 7. Muchos autores utilizan la vía intradérmica en la base de la cola en ratas endocriadas, Lewis et al., describen el desarrollo de edema y artritis a partir de las 2 semanas¹⁸. Ciertas diferencias podrían deberse a la susceptibilidad de las cepas de ratas a generar artritis

sistémicas; en nuestro trabajo usamos ratas de la cepa Sprague Dolley que según la bibliografía se encuentran entre las cepas capaces de producir artritis sistémicas^{4,19}. Otros autores que también usaron las vías subplantar observaron edema e inflamación en la pata, que alcanzó el punto máximo al día 5-7, para luego entrar en una etapa más crónica hacia el día 20²⁰.

El modelo de CLX se ha realizado en diversas especies animales anteriormente como son caninos, conejos, cobayos y ratas¹². El modelo de CLX está indicado para generar inestabilidad a la articulación y desencadenar artritis a mediano o largo plazo, sin embargo, algunos trabajos han observado lesiones histopatológicas y radiológicas en el transcurso de 2 semanas²¹. Al igual que otros modelos no estudiados en este trabajo, como la artritis inducida por colágeno y la artritis inducida por antígeno, se observan en los modelos de AIA y ASP lesiones histopatológicas al día 7. Estas lesiones se caracterizan por inflamación sinovial y erosión temprana del cartílago articular.

La IL-1 β se encuentra elevada respecto al control en los 3 modelos de artritis probados, lo cual podría indicar que

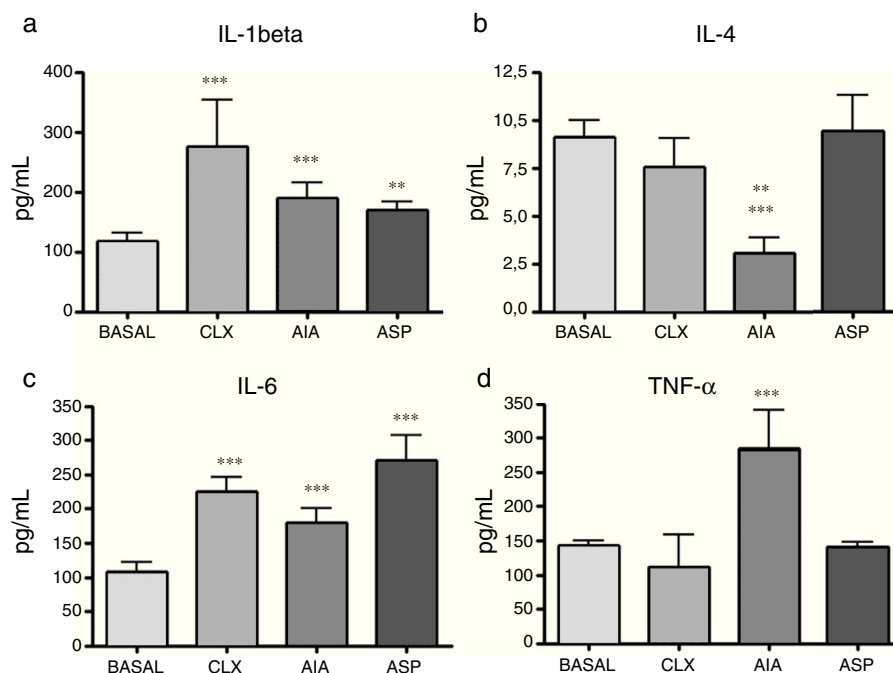


Figura 6 - Concentración de citoquinas en las ratas basales y pertenecientes a los diferentes modelos de artritis estudiados. Se aplicó ANOVA seguido del test de Tukey. a) IL-1 β : los modelos CLX y AIA (*) $p < 0,001$ vs. basal, ASP vs. basal (** $p < 0,01$). b) IL-4: AIA vs. basal y ASP (***) $p < 0,001$, AIA vs. CLX (** $p < 0,01$). c) IL-6: ASP, AIA y CLX, (***) $p < 0,001$ vs. basal. d) TNF- α : AIA (***) $p < 0,001$ vs. el grupo basal y los otros 2 modelos (CLX y ASP).**

sería esta citoquina un posible blanco general para el control de las artritis de diferente tipo. El uso del receptor antagonista de la IL-1 β mostró resultados variables en diferentes modelos inflamatorios²² y en pacientes con OA²³. Por otra parte, algunos trabajos mostraron efectos protectores en lo relacionado con la degradación del cartílago articular y la progresión de la erosión ósea²⁴. Por el lado de las citoquinas, el modelo de AIA es el que mayor incremento del TNF- α ha producido. El incremento del TNF- α ha sido asociado con un incremento de infiltrados leucocitarios que llevan a la inflamación, dolor y daño articular. El incremento de TNF- α ha sido asociado en medicina humana a ciertos tipos de artritis tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante. Los incrementos de IL-1 β y TNF α han sido relacionados con la inducción de MMP, que son las que estarían vinculadas a la destrucción de la matriz extracelular y al daño articular propiamente dicho²⁵. Asimismo, en modelos de inyección de IL-1 β al espacio articular se observó que en la artritis que se desencadenaba se perdían proteoglicanos

del cartílago articular²⁶. También se presentó incremento de IL-1 β en otros modelos, como es el caso de la artritis inducida por colágeno²⁷. Otros trabajos demostraron que el TNF- α se encontraría elevado en estadios tempranos de la enfermedad articular, mientras que la IL-1 β se encontraría elevada por más tiempo²⁸. La supresión de TNF- α ha demostrado tener efectos beneficiosos en diferentes modelos de artritis autoinmunes²⁹. Además de la importancia que presentan estas citoquinas por el rol que cumplen en el proceso inflamatorio, se ha descrito que la IL-1 β , IL-6 y el TNF- α participan directamente mediando el dolor en terminaciones nociceptivas articulares³⁰. También se ha demostrado que la IL-6 cumple un rol importante en la destrucción del cartílago articular en las artritis inducidas. Asimismo, en nuestro trabajo la IL-4 encontró los niveles más bajos en el modelo de AIA. La IL-4 está relacionada con un efecto, en los modelos de artritis, que sería el de reducir la inflamación, las citoquinas proinflamatorias, la vascularización y la destrucción ósea. La MMP-9 en el modelo CLX presenta valores mínimos, similares a los de los animales

basales, mientras que esta proteasa se encuentra sumamente elevada en el modelo de AIA, en coincidencia con el mayor daño articular.

El modelo que presentó variación significativa respecto del grupo control, en la mayor cantidad de variables, es el modelo de AIA. Pero IL-1, al día 7, presentó diferencia significativa en todos los modelos respecto del basal, siendo esta más marcada en el CXL, y para la IL-4 se observó el valor más bajo en el grupo AIA. Este trabajo permitió evaluar y comparar el comportamiento de las diferentes variables en cada modelo, en una fase temprana pero aguda de la enfermedad articular, lo cual puede ser útil al momento de elegir trabajar en un modelo agudo de OA. Por otra parte, el modelo de ASP resultó ser muy útil como modelo de inflamación clínica a los 7 días y fue el que más elevación presentó en la MMP-2. Si bien se usan y se comparan de manera indistinta los modelos de artritis en ratas como si fueran similares, en este trabajo demostramos que en un estadio temprano los modelos se comportan de manera diferente en la mayoría de las variables estudiadas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Proyecto UBACYT 20020120100092BA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Tannenbaum J. Ethics and pain research in animals. *ILAR J.* 1999;40:97-110.
- Bendele A, Mc Comb J, Gould TY, Mc Abee T, Sennello G, Chlipala E, et al. Animal models of arthritis: Relevance to human disease. *Toxicol Pathol.* 1999;27:134-42.
- Lorentzen JC, Glaser A, Jacobsson L, Galli J, Fakhrirad H, Klareskog L, et al. Identification of rat susceptibility loci for adjuvant-oil-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:6383-7.
- Cai X, Wong YF, Zhou H, Liu ZQ, Xie Y, Jiang ZH, et al. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. *Inflamm Res.* 2006;55:368-77.
- Van Eden W, Thole JE, Zee R, Noordzij A, van Embden JD, Hensen EJ, et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature.* 1988;331:171-3.
- Miletic T, Kovacevic-Jovanovic V, Stanojevic S, Vujic V, Kosec D, Mitic K, et al. Strain differences and the role for HSP47 and HSP70 in adjuvant arthritis in rats. *Scand J Immunol.* 2006;64:623-32.
- Shahrara S, Proudfoot AE, Woods JM, Ruth JH, Amin MA, Park CC, et al. Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1907-19.
- Woode E, Boakye-Gyasi E, Danquah CA, Ansah C, Duwiewua M. Anti-arthritic effects of Palisota hirsuta K. Schum. leaf extract in Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Int J Pharmacol.* 2009;5:181-90.
- Liu YL, Lin H, Zou R, Jchao W, Han R, Raymond LN, et al. Suppression of complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis by cobra toxin. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30:219-27.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med.* 1985;162:2163-8.
- Ferrández ML, Terencio MC, Carceller MC, Ruhi R, Dalmau P, Vergés J, et al. Effects of BIS076 in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomized rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:92.
- Bendele AM. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2001;37:7-85.
- Sahebari M, Mahmoudi Z, Zamani S, Rabe T, Haghmorad D, Mahmoudi MB, et al. Inhibitory effect of aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L) on adjuvant-induced arthritis in wistar rat. *Pharmacologyonline.* 2011;3:802-8.
- McDougall JJ, Karimian SM, Ferrell WR. Prolonged alteration of sympathetic vasoconstrictor and peptidergic vasodilator responses in rat knee joints by adjuvant-induced arthritis. *Exp Physiol.* 1995;80:349-57.
- De Simone E, Caggiano N, Polli M, Rolando J, Lastra Y, Gullace F, et al. Efecto del alendronato sobre el perfil de citoquinas y metaloproteinasas 2 y 9 en un modelo murino de artritis experimental. *Rev Colomb Reumatol.* 2013;20:202-10.
- Pritzker KPH, Gay S, Jiménez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage and histopathology: Grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:13-29.
- Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 2002;46:802-5.
- Bevaart L, Vervordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis? How does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2010;62:2192-205.
- Kim EY, Moudgil KD. The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:239.
- Jacobson PB, Morgan SJ, Wilcox DM, Nguyen P, Ratajczak CA, Carlson RP, et al. A New spin on an old model. In vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2060-73.
- Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:632-41.
- Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20:879-96.
- Chevalier X, Giraudeau B, Conrozier T, Marliere J, Kiefer P, Goupille P. Safety study of intraarticular injection of interleukin 1 receptor antagonist in patients with painful

- knee osteoarthritis: A multicenter study. *J Rheumatol.* 2005;32:1317-23.
24. Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, et al. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: Radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1001-9.
 25. Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest.* 1986;77:645-8.
 26. Pettipher ER, Henderson B, Moncada S, Higgs GA. Leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan loss in immune arthritis in the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1988;95:169-76.
 27. Van Lent PL, van de Loo FA, Holthuysen AE, van den Bersselaar LA, Vermeer H. Major role for interleukin 1 but not for tumour necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J Rheumatol.* 1995;22:2250-8.
 28. Ulfgren AK, Grondal L, Lindblad S, Khademi M, Johnell O, Klareskog L, et al. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: Potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:439-47.
 29. Baharav E, Bar-Yehuda S, Madi L, Silberman D, Rath-Wolfson L, Halpren M, et al. Antiinflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists in murine autoimmune arthritis models. *J Rheumatol.* 2005;32:469-76.
 30. Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:470.