

## INVESTIGACIÓN

### Modelo murino de lesión osteocondral: alternativa para trabajos experimentales



R. Martínez\*, D. Figueroa, R. Calvo, P. Conget, M. Gallegos, F. Figueroa y X. Ahumada

Facultad de Medicina Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile

Recibido el 13 de junio de 2014; aceptado el 30 de junio de 2014

Disponible en Internet el 5 de agosto de 2014

#### PALABRAS CLAVE

Lesión osteocondral;  
Modelo animal;  
Ratón;  
Cartilago

#### Resumen

**Objetivo:** Analizar un modelo murino adulto de lesión osteocondral crítica (LOC) que sea reproducible y de bajo costo para estudios de experimentación.

**Material y método:** Se desarrolló un trabajo experimental en 20 ratones BKS, de 15 semanas, realizando una LOC en el surco troclear de 0,5 mm de diámetro. Diez animales fueron sacrificados a los 7 y 14 días tras la cirugía. Para evaluar la capacidad de reparación o regeneración del modelo, se realizó un análisis histológico, mediante tinción de hematoxilina-eosina y safranina-O, evaluando con la escala ICRS-II. Se comparó la zona de lesión con áreas de cartilago sano del mismo animal (zonas control). Las puntuaciones obtenidas (promedios) en cada grupo se compararon entre sí determinándose diferencias significativas.

**Resultados:** En la evaluación en los días 7 y 14 se encontró una diferencia significativa entre la zona de la LOC y las zonas control, sin existir diferencias entre los 2 períodos evaluados.

**Conclusión:** El modelo murino adulto de LOC crítica, en la tróclea femoral, es altamente reproducible. La potencialidad de regeneración innata del animal secundaria a la presencia de fisas durante la vida adulta no logró reparar adecuadamente la lesión producida sobre el cartilago articular. Este modelo permitirá la realización de nuevos estudios orientados a obtener mejores tratamientos para las patologías condrales.

© 2014 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

#### KEYWORDS

Osteochondral lesion;  
Animal model;  
Mice;  
Cartilage

#### Osteochondral lesion mouse model: An alternative for experimental work

#### Abstract

**Objective:** To report a reproducible and inexpensive model of critical osteochondral lesion (LOC) in adult mice for experimental studies

**Material and method:** An experimental study was conducted on 20 BKS mice of 15 weeks old, in which a LOC of 0.5 mm in diameter was made in the trochlear groove. Ten animals were

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [doctormartinez@gmail.com](mailto:doctormartinez@gmail.com) (R. Martínez).

sacrificed at day 7, and the other 10 animals at day 14 of follow up. To assess the ability of the animal to repair/regenerate, a histological analysis was performed using hematoxylin-eosin and safranin-O stains, and the results were evaluated by the ICRS scale using areas of healthy cartilage from the same joint as control. The Mann-Whitney U test was used for the statistical analyses of scores (averages).

**Results:** Significant differences were found in days 7 and 14 between the LOC area and control areas, but no differences were found between the day 7 and day 14.

**Conclusion:** This model of LOC in the trochlear groove of adult mice is highly reproducible, and could be used in further studies to obtain better treatments for chondral pathologies.

© 2014 SECOT. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

Las patologías que afectan al cartílago articular como son las lesiones condrales y osteonrales (LOC), precursoras de la artrosis (*osteoarthritis* [OA]), han ocupado un alto número de publicaciones en la bibliografía internacional debido a la baja capacidad de reparación de este tejido y por falta de tratamientos óptimos disponibles<sup>1</sup>. Esto ha ocasionado un creciente interés en el desarrollo de estrategias experimentales capaces de generar conocimientos fisiopatológicos para evaluar, adecuadamente, los nuevos tratamientos. Por ello, el desarrollo de modelos animales de experimentación es fundamental en los trabajos de investigación para desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras, entre las que actualmente se encuentran la utilización de plasma rico en plaquetas<sup>2</sup>, el implante autólogo de condrocitos asociados a membrana y, más recientemente, algunas experiencias con células mesenquimales pluripotenciales<sup>3</sup>, reafirmando la importancia de este tipo de modelos experimentales.

En la bibliografía se recogen múltiples modelos animales en las investigaciones relativas a LOC<sup>4-7</sup>, entre los que destacan los modelos con animales medianos (conejos y perros) y grandes (ovejas y caballos). Sin embargo, hay pocas evaluaciones de los modelos de roedores para el estudio de patologías osteocondrales, pese a que por sus bajos costos, altas tasas de reproducción y facilidades de manutención son modelos altamente deseables. La principal crítica planteada a estos animales es su alta tasa de reparación espontánea de las LOC, siendo utilizados fundamentalmente en estudios sobre alteraciones genéticas para generar una OA espontánea<sup>7,8</sup>. Sin embargo, reparación potencial de las LOC en modelos de ratones adultos no se ha validado en ningún estudio publicado. El objetivo del presente trabajo es analizar un modelo murino adulto de LOC crítica que sea reproducible y de bajo costo para estudios de experimentación.

## Material y método

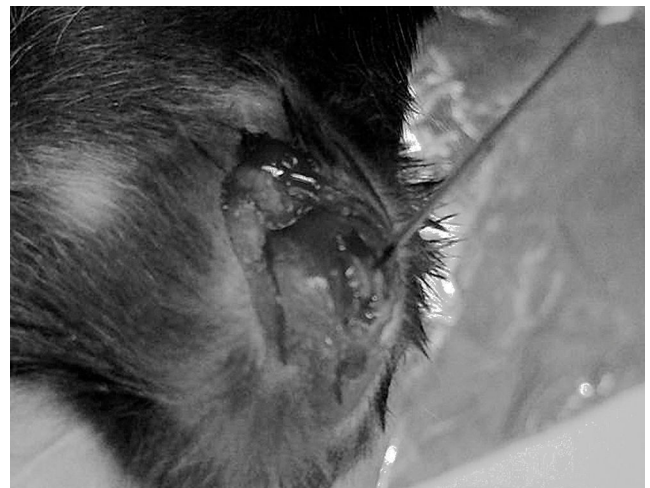
### Animales

Previo aprobación del comité de bioética de nuestra institución, 20 ratones hembra de cepa BKS de 15 semanas fueron obtenidos del bioterio de nuestra institución de acuerdo con

las normas de manejo animal del *Animal Care of the US National Institutes of Health*<sup>9</sup>.

### Modelo quirúrgico de lesión osteocondral

Los animales fueron anestesiados inhalatoriamente con una mezcla de sevoflurano/oxígeno en relación 3%/32%. En ambas rodillas del animal, se realizó el mismo procedimiento quirúrgico. Con un bisturí número 15 se efectuó un abordaje longitudinal parapatelar medial en extensión de las extremidades inferiores hasta exponer el aparato extensor. Posteriormente se procedió a una artrotomía parapatelar medial luxando digitalmente hacia lateral la patela, dejando expuesto de esta forma los cóndilos y la tróclea femoral. Mediante visualización con lupas quirúrgicas, se identificó el surco troclear y, con un agujero 25 G (0,5 mm diámetro), se realizó una LOC única en la región central, penetrando hasta atravesar el hueso subcondral (fig. 1). Bajo visualización directa, se realizó la reducción del aparato extensor, confirmándose la adecuada movilidad de la articulación patelo-femoral. El cierre de la artrotomía parapatelar medial y del abordaje de piel se realizó con 2 planos de prolene 6.0 con punto corrido. Se finalizó la anestesia inhalatoria y se administró 10 mg/kg de tramadol sublingual



**Figura 1** Surco troclear y realización de LOC de 0,50 mm de diámetro con aguja 25 G. Para una mejor manipulación, la lesión se realizó con la rodilla en flexión.

**Tabla 1** Escala histológica semicuantitativa de la reparación del cartilago articular de la *International Cartilage Repair Society*

Categoría	Puntuación
<i>Porcentaje de llenado del defecto</i>	
100	4
75	3
50	2
25	1
0	0
<i>Continuidad de la superficie articular</i>	
Suave y continuo	3
Rugoso pero continuo	1
Discontinuo	0
<i>Restauración de la arquitectura osteocondral</i>	
Claramente diferenciado	4
No claro (heterogéneo)	2
Pobre (compartimentalización óseo-condral)	1
No existente	0
<i>Integración del tejido reparativo</i>	
Completo	3
Parcial	1
Pobre	0
<i>Morfología celular del tejido regenerativo del cartilago articular</i>	
Hialino con arquitectura zonal	5
Hialino sin arquitectura zonal	3
Cartilago híbrido fibrohialino	2
Fibrocartilago	1
Tejido fibroso	0
<i>Tinción de matriz (metacromasia)</i>	
Normal (comparado con cartilago adyacente)	3
Levemente reducida	2
Marcadamente reducida	1
Sin tinción metacromática	0

para analgesia. A los animales se les permitió movilidad *ad libitum* inmediatamente finalizada la cirugía. No hubo complicaciones quirúrgicas, sobreviviendo todos los animales. Los animales, una vez despertados de la anestesia, no presentaron dificultades mayores a la deambulacion con sus 4 extremidades (tabla 1).

#### Sacrificio y obtención de piezas quirúrgicas

Diez animales fueron sacrificados al séptimo día y otros 10 animales el día 14 tras la cirugía mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico, a dosis de 100 mg/kg. Se repitió el abordaje quirúrgico ya explicado, exponiéndose el aparato extensor hasta el tercio medio del muslo. Se seccionó la musculatura flexora y extensora de la rodilla, liberándola de sus inserciones óseas de proximal a distal, logrando de esta forma el desplazamiento por delante de todo el aparato extensor y dejando expuesta la zona de los cóndilos femorales. Con apoyo de lupas quirúrgicas, se procedió a desarticular cuidadosamente la región proximal

de la rodilla, evitando dañar el cartilago articular durante el procedimiento. Al obtener las piezas quirúrgicas, se produjo la fractura de los cóndilos femorales en una rodilla del grupo de 7 días y en una rodilla en el grupo de 14 días. Las muestras así obtenidas fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, durante 48 h, previo a su inclusión en parafina.

#### Análisis histológico

De las muestras incluidas en parafina, se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu$ m los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina y safranina-O. Para evaluar la reparación o regeneración producidas en las lesiones inducidas, se utilizó la escala semicuantitativa para la reparación del cartilago articular de la *International Cartilage Repair Society II*. Esta escala mediante un análisis de 6 variables (porcentaje de llenado del defecto, continuidad de la superficie articular, restauración de la arquitectura osteocondral, integración del tejido reparativo, morfología celular del tejido regenerativo condral y metacromasia) ofrece una puntuación que indica la calidad de la reparación obtenida<sup>10</sup>.

#### Análisis estadístico

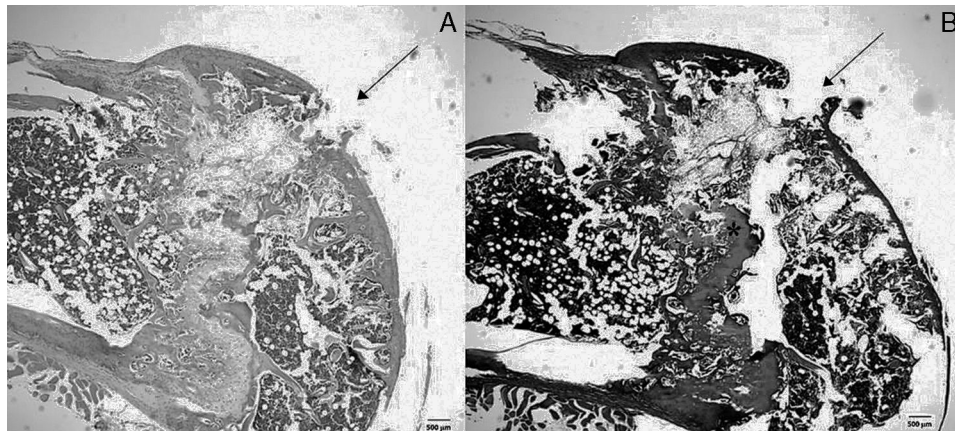
Se realizó una estadística descriptiva de los valores obtenidos y para evaluar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre los grupos, se utilizó el test de U de Mann-Whitney para muestras continuas.

## Resultados

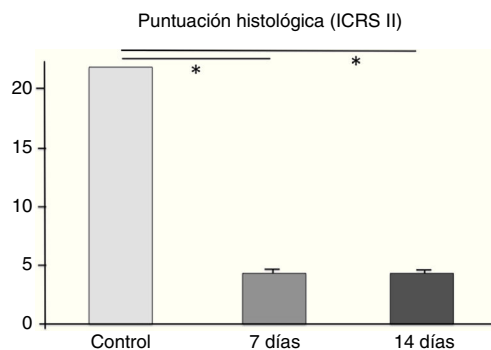
En las 38 rodillas evaluadas (19 rodillas por cada período), las LOC fueron visibles macroscópicamente y microscópicamente tanto al día 7 como al día 14. Al realizar el análisis microscópico, se detectó una solución de continuidad en la superficie condral compatible con el instrumental utilizado para la realización de la LOC de 0,5 mm de diámetro en todas las muestras analizadas. Por su parte, la profundidad de la lesión en todos los casos comprometió al menos hasta la fisis del animal (fig. 2 A y B).

Al analizar los cortes histológicos a los 7 días, se encontró un tejido conectivo reparativo de características inflamatorias, sin observar la presencia de condrocitos en la región dañada (fig. 2 A). En la tinción con safranina-O se observó que, pese a este intento de reparación, las características de la matriz extracelular en la zona de la lesión fueron claramente diferentes de las del tejido condral circundante, con una notable disminución en la cantidad de glucosaminoglicanos. La puntuación histológica obtenida fue de  $4,2 \pm 0,29$ , mostrando diferencias significativas con la región control (cartilago normal, 22 puntos,  $p < 0,001$ ).

En el grupo de animales evaluados a los 14 días, los resultados histológicos fueron similares a los descritos, destacando una menor presencia de células inflamatorias. En una rodilla se determinó un cuadro compatible con una osteomielitis aguda en comunicación con la LOC inducida. Al analizar la puntuación histológica obtenida, esta fue de  $4,1 \pm 0,33$ , existiendo diferencias significativas con la región control ( $p < 0,001$ ). Al comparar los resultados obtenidos entre los 2 tiempos evaluados, estos no mostraron diferencias significativas (fig. 3).



**Figura 2** Análisis histológico de la LOC producida. Se muestra un corte sagital de la región troclear de un animal sacrificado a los 7 días representativo de la muestra completa. A) Tinción de hematoxilina-eosina en la cual se aprecia la solución de continuidad de la superficie articular. B) Tinción de safranina-O; se logra identificar la LOC y la profundidad que compromete hasta la fisis (\*).



**Figura 3** Puntuación histológica (ICRS II) con diferencias estadísticamente significativas con la región control, sin existir diferencias entre los 2 tiempos evaluados.

\*  $p < 0,05$ .

## Discusión

Se han planteado diferentes modelos animales para el estudio de la fisiología y la fisiopatología condral, destacando la utilización de animales menores, como conejos y perros, y mayores, como ovejas y caballos. Sin embargo, las complejidades en la utilización de este tipo de animales han generado que la disponibilidad de estos modelos sea limitada, en especial para estudios en los que se está iniciando la transferencia de conocimientos desde modelos *in vitro*. Los animales menores, entre los que se encuentran los roedores, presentan ventajas comparativas para el desarrollo de la investigación médica, destacando sus bajos costos de mantenimiento, alta tasa de reproducción, corto tiempo experimental y reproducibilidad de sus resultados, además de existir animales atómicos, transgénicos y *knockout* para ciertas patologías, por lo que son una alternativa atractiva como primer modelo animal<sup>8</sup>.

Entre las principales desventajas atribuidas a los modelos experimentales con roedores se describe el pequeño tamaño de la articulación, el bajo grosor del cartílago articular y la alta tasa de regeneración o reparación espontánea que mantendrían durante su vida adulta debido a la persistencia de la fisis, lo cual pudiera influir negativamente en el momento

de evaluar terapias<sup>11</sup>. Sin embargo, al revisar la bibliografía disponible, no hemos encontrado publicaciones de modelos en ratones adultos en que se describa esta regeneración o reparación espontánea de las lesiones condrales u osteocondrales, existiendo solo una publicación de LOC enfocado en ratones jóvenes (8 semanas), en los cuales se demostró parcialmente esta capacidad reparativa intrínseca<sup>12</sup>. De manera similar, en animales que comparten gran parte de las características descritas con nuestro modelo, como son las ratas, se han desarrollado adecuados estudios de alternativas terapéuticas para el estudio de las LOC<sup>13</sup>.

Nuestros resultados fueron consistentes tanto a los 7 como a los 14 días en la capacidad de generar LOC reproducibles y de un tamaño crítico que, si bien inducen un proceso reparativo por parte del organismo, como se puede apreciar por la llegada de células inflamatorias, no logran ser adecuadamente recubiertas por neot tejido condral, lo cual se vio reflejado en los puntajes histológicos.

Si bien se reconoce que las células progenitoras derivadas de la fisis en los murinos tienen la potencialidad de reparar los daños a nivel articular, al igual que lo que ocurre en el ser humano, los procesos moleculares e histológicos por el que se produce esta reparación no están del todo aclarados<sup>14</sup>. Conocido es que la embriogénesis del cartílago articular es temprana en los murinos, pudiendo identificarse el cartílago articular a las 2 semanas de desarrollo embrionario<sup>15</sup>, lo cual induce a pensar que el tiempo necesario para regenerar el cartílago dañado debiera estar en este orden de magnitud. Por ello, los tiempos evaluados en el presente trabajo (7 y 14 días de evolución natural de la LOC) permiten determinar la potencialidad de reparación innata del animal adulto, siendo a nuestro juicio estos cortos tiempos de seguimiento requeridos una fortaleza de nuestro modelo propuesto. Lo anterior además se apoya en la disminución en la respuesta reparativa inicial, caracterizándose por una disminución del componente celular de células inflamatorias vista a los 14 días, fenómeno similar al publicado en modelos de LOC de otras especies animales<sup>13</sup>. La baja puntuación histológica obtenida en los 2 tiempos evaluados es concordante con la baja capacidad de los animales adultos de reparar esta lesión crítica generada independiente de la persistencia de la fisis

y nos parece fundamental, ya que demuestra que nuestro modelo quirúrgico permitirá observar mejoras significativas en relación con la capacidad regenerativa de ciertos tratamientos.

Dentro de las limitaciones específicas de nuestro modelo está el hecho de que el modelo animal propuesto no corresponde a las LOC clásicas que se aprecian en la práctica clínica, tanto por mecanismo causal como por la zona en la que estas se producen. En humanos, las LOC se presentan principalmente en los cóndilos femorales, los cuales, al ser zona de carga, tienen un comportamiento diferente en relación con su potencialidad de reparación. Por lo anteriormente expuesto, el modelo murino adulto de LOC crítica a nivel de la tróclea femoral mostrado en este estudio es altamente reproducible. En nuestros resultados, la potencialidad de regeneración innata del animal secundaria a la presencia de fisis durante la vida adulta no logró reparar adecuadamente la lesión producida quirúrgicamente sobre el cartilago articular. Este modelo permitirá la realización de nuevos estudios orientados a obtener mejores tratamientos para las patologías condrales.

## Nivel de evidencia

Nivel de evidencia I.

## 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

Para la realización de este estudio se contó con el apoyo de fondos concursables de investigación de la Universidad del Desarrollo (proyecto 23.400.099) y de la Sociedad Chilena de Ortopedia y Traumatología, sin que estos recursos hayan generado conflictos de interés que declarar.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Universidad del Desarrollo y a la Sociedad Chilena de Ortopedia y Traumatología

por proporcionar los fondos con los que se realizó el trabajo.

## Bibliografía

- Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. 2014. En prensa.
- Zhu J, Cai B, Ma Q, Chen F, Wu W. Cell bricks-enriched platelet-rich plasma gel for injectable cartilage engineering. An in vivo experiment in nude mice. *J Tiss Eng Regen Med*. 2013;7:819–30.
- Huang GS, Tseng CS, Linju YB, Dai LG, Hsieh PS, Hsu SH. Solid freeform-fabricated scaffolds designed to carry multicellular mesenchymal stem cell spheroids for cartilage regeneration. *Eur Cells Mater*. 2013;26:179–94.
- Suwannaloet W, Laupattarakasem W, Sukon P, Ong-Chai S, Laupattarakasem P. Combined effect of subchondral drilling and hyaluronic acid with/without diacerein in full-thickness articular cartilage lesion in rabbits. *Sci World J*. 2012, 310745.
- Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, Hidaka C, Nixon AJ. Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med*. 2005;33:1647–53.
- Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A, Postacchini R, et al. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: An experimental study in an animal model. *Arthroscopy*. 2012;28:688–701.
- Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B*. 2010;16:105–15.
- Vo N, Niedernhofer LJ, Nasto LA, Jacobs L, Robbins PD, Kang J, et al. An overview of underlying causes and animal models for the study of age-related degenerative disorders of the spine and synovial joints. *J Orthop Res*. 2013;31:831–7.
- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (2011).
- Kim SS, Kang MS, Lee KY, Lee MJ, Wang L, Kim HJ. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid injection on osteochondral defects in rabbits' knees. *Knee Surg*. 2012;24:164–72.
- Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: A systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:705–13.
- Eltawil NM, de Bari C, Achan P, Pitzalis C, Dell'Accio F. A novel in vivo murine model of cartilage regeneration. Age and strain-dependent outcome after joint surface injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:695–704.
- Hapa O, Cakici H, Yuksel HY, Firat T, Kukner A, Aygun H. Does platelet-rich plasma enhance microfracture treatment for chronic focal chondral defects? An in-vivo study performed in a rat model. *Acta Orthop Traum Turc*. 2013;47:201–7.
- Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: Recent advances, but many lingering mysteries. *Birth defects research. Part C. Embryo Today*. 2005;75:237–48.
- Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, et al. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Develop Biol*. 2008;316:62–73.