



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MODELO DE ARTRITIS EN
PEQUEÑOS ROEDORES DE LABORATORIO PARA EL
ESTUDIO DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**

Aida Ivette Rojas Sabogal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia

2019

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MODELO DE ARTRITIS EN
PEQUEÑOS ROEDORES DE LABORATORIO PARA EL
ESTUDIO DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**

Aida Ivette Rojas Sabogal

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Farmacología

Director:

Ph.D., Químico Farmacéutico Luis Fernando Ospina Giraldo

Grupo de Investigación “Principios Bioactivos en Plantas Medicinales”

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias.

Departamento de Farmacia.

Bogotá D.C. Colombia

2019

A mis padres, por enseñarme con su ejemplo de vida el trabajo serio, honesto y principalmente el amor a Dios y a la Virgen.

A Dios por brindarme la oportunidad de un nuevo reto.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Fernando Ospina Giraldo Ph.D., Químico Farmacéutico, por su enseñanza y guía, sin la cual este trabajo no hubiese sido posible.

Al Dr. Juan Carlos Ospina Médico Veterinario, por compartir su conocimiento en el área de la histopatología.

Resumen

El presente trabajo de investigación establece las condiciones para la implementación de un modelo de inflamación crónica en ratas Wistar, hembras, pesos entre 170 y 200 gramos y con edad entre 10 y 13 semanas, así como el desarrollo de la misma en los aspectos fisiopatológicos, histopatológicos y radiológicos. El esquema de administración seleccionado permite la reproducción de un cuadro artrítico que puede ser evaluado en su evolución con equipos de medición como caliper digital y calibrador micrométrico. Adicionalmente los métodos de detección de mediadores proinflamatorios pueden adaptarse a modelos que busquen evaluar nuevos fármacos y determinar su mecanismo de acción seleccionando el blanco de su actividad. Técnicas básicas de detección de metabolismo de peroxidación lipídica o cuantificación de proteínas dan indicios del proceso inflamatorio en forma general.

Palabras clave: Artritis, inflamación crónica, tratamiento antiinflamatorio, modelos animales en inflamación crónica, mediadores de inflamación.

Abstract

The present work establish the conditions for the implementation of a model of chronic inflammation in female Wistar rats with weights 170 to 200 grams and 10 to 13 weeks old, as well as its follow up since the development of the same in the physiopathological, histopathological and radiological aspects. The selected administration scheme allows the reproduction of an arthritic process that can be evaluated by a digital caliper and a screw micrometer. Additionally, the detection methods of proinflammatory mediators can be adopted in screening models intended to find new drugs and determine their mechanism of action based in their target. Basic techniques for detecting lipid peroxidation metabolism or protein quantification give information of the inflammatory process in general.

Keywords: Arthritis, chronic inflammation, anti-inflammatory treatment, animal models in chronic inflammation, mediators in inflammation.

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Abstract	V
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Introducción	1
Marco teórico	3
1.1 Inflamación.	3
1.2 Artritis reumatoide.....	5
En el tratamiento de la artritis crónica se han utilizado los glucocorticoides que basan su mecanismo de acción en suprimir la producción de inmunoglobulina G a partir de las células B y las citoquinas de linfocitos y activación de células T ayudadoras, la liberación de células mesenquimales y la diferenciación de osteoblastos reduciendo la lesión a nivel óseo (Baschant <i>et al.</i> , 2012)	7
1.2.1 Modelos animales en inflamación crónica (artritis reumatoidea)	7
1.2.2 Artritis inducida por colágeno (AIC) en ratas.	9
1.2.3 Artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones.	10
1.2.4 Artritis inducida por adyuvante en ratas.	10
1.2.5 Artritis inducida por Avridina.	11
1.2.6 Artritis inducida por administración de endotoxina bacteriana en ratas.	11
1.2.7 Artritis inducida por albúmina sérica bovina.	12
Enfoque de la investigación.	13
Materiales y métodos.	14
3.1 Animales de experimentación. Aspectos éticos.	14
3.2 Reactivos.....	14
3.3 Materiales y equipos.....	15
3.4 Determinación de proteínas (Ácido bicinconínico).	15
3.5 Determinación de Interleucinas.....	16
3.6 Determinación de TBARs.	17
3.7 Desarrollo del modelo de artritis por adyuvante.	17
3.7.1 Inducción y tratamiento de la inflamación.	17
3.7.2 Caracterización de la inflamación.	19
3.7.3 Parámetros bioquímicos.	21
3.7.4 Evaluación histopatológica.	21
3.7.5 Estudio radiográfico.	23

Resultados y Discusión	24
4.1 Inducción y tratamiento de la inflamación	24
4.2 Caracterización de la inflamación.	25
4.2.1 Evolución del peso.....	25
4.2.2 Medidas anatómicas.	26
4.2.3 Parámetros bioquímicos.	28
	* 28
Conclusiones y Recomendaciones	41
A. ANEXO: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (ÁCIDO BICINCONÍNICO)	43
B. ANEXO: PRUEBA PARA DETECCIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS MEDIANTE EL KIT COMERCIAL MILLIPORE MAP KIT	47
C. ANEXO: PRUEBA TBARS	52
D. Anexo:Procedimiento para inducción de artritis en pequeños roedores de laboratorio	54
E. Anexo. Reportes radiográficos	57
F. Anexo. Aval ético	61
Bibliografía	64

Lista de figuras

	Pág.
Figura. 1-1 Producción de mediadores en la respuesta inmune.	4
Figura. 1-2 Papel de la inflamación en osteoartritis.	6
Figura. 3-1 Animales artríticos por administración de Adyuvante de Freund y Colágeno tipo II	19
Figura. 3-2 Puntos anatómicos de evaluación con calibrador micrométrico.....	20
Figura. 3-3 Puntos anatómicos de evaluación con caliper digital.....	20
Figura. 3-4 Manejo de animal al momento de la inspección.	22
Figura. 4-1 Comparativo concentración de proteínas en animales artríticos.....	28
Figura. 4-2 Perfiles de interleucina IL1 β , IL10, TNF α en grupos control y tratado.....	29
Figura. 4-3 Corte histológico animal normal.	32
Figura. 4-4 Corte histológico animal no reactivo.	33
Figura. 4-5 Corte histológico animal control.....	34
Figura. 4-6 Corte histológico animal artrítico tratado con dexametasona.....	35
Figura. 4-7 Placas radiográficas animal normal (no artrítico).....	37
Figura. 4-8 Placas radiográficas animal control (artrítico sin tratamiento con dexametasona)	38
Figura. 4-9 Placas radiográficas animal tratado con dexametasona	40

Lista de tablas

	Pág.
Tabla. 1-1: Principales modelos de roedores utilizados para inducir artritis.	8
Tabla. 4-1 Medidas equivalentes en los equipos de medidas externa en diferentes equipos.	25
Tabla. 4-2 Evolución del peso en animales artríticos.	26
Tabla. 4-3 Comparación de las medidas externas (mm) utilizando calibrador micrométrico, en grupos control y tratados.	27
Tabla. 4-4 Comparación de las medidas externas (mm) utilizando caliper digital, en grupos control y tratados.	28
Tabla. 4-5 Concentración MDA en tejidos de animales artríticos.	31
Tabla. 4-6 Hallazgos histopatológicos en animal normal.	32
Tabla. 4-7 Hallazgos histopatológicos en animal no reactivo.	33
Tabla. 4-8 Hallazgos histopatológicos en animal control (artrítico sin tratamiento).	34
Tabla. 4-9 Hallazgos histopatológicos en animal artrítico tratado con dexametasona.	35

Introducción

La inflamación se define como el proceso patológico que involucra una complejidad de reacciones químicas y celulares en los tejidos, como una respuesta a una injuria o estimulación anormal. Los signos cardinales de la inflamación: Dolor, rubor, calor y tumor se presentan como actividades generadas por el organismo para destruir o remover material extraño, promueven la reparación y recuperación (Iwalewa *et al.*, 2007). Predisposiciones genéticas y fallos para resolver la inflamación aguda en cuanto a la remoción por neutralización y eliminación del agente causal de la injuria resultan en una predisposición para el desarrollo de inflamación crónica (Lawrence & Gilroy, 2007).

Conocer e identificar la patogénesis de las enfermedades, en este caso las relacionadas con la inflamación de tipo crónico, ha permitido el desarrollo de modelos animales con el fin de estudiar la actividad de nuevas moléculas, la selección de estos modelos se encuentra sujeta a las similitudes entre el modelo animal propuesto y la patogénesis del cuadro en humano (Uriel, 2008). Los modelos animales facilitan el entendimiento del desarrollo fisiopatológico de la enfermedad, permite el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la misma, basándose principalmente en la similaridad de las condiciones de la enfermedad en humanos y amplía las herramientas para proponer nuevas alternativas terapéuticas en el control de inflamaciones crónicas tipo artritis reumatoidea (Naik and Wala, 2014).

La artritis reumatoidea es una enfermedad de etiología desconocida, de tipo crónico, inhabilitante, de carácter autoinmune que genera inflamación en articulación y severa destrucción ósea y de superficie articular (Cuzzocrea, 2011). A nivel mundial la presentación del cuadro se estima en un 1 % de la población (Zhang *et al.*, 2014), afectando principalmente mujeres en una proporción 3:1 en la población occidental. En Colombia algunos estudios han encontrado una prevalencia de punto de 0,905 para usuarios del sistema de salud en mayores de 15 años , con una relación mujer:hombre de 4,23 , situación similar con lo encontrado en Latinoamérica (Díaz-Rojas *et al.*, 2016), datos

recientes reflejan una prevalencia de 0,52% en mayores de 18 años de los cuales 80,7% son mujeres, con una mayor participación de pacientes en rango de edad entre 70 y 74 años (Fernández-Ávila *et al.*, 2019). Esta patología permite el desarrollo de diferentes estudios sobre el impacto económico, opciones de tratamiento, desarrollo de guías de tratamiento, estudios de desarrollo de fármacos que curen o disminuyan la sintomatología y gravedad de las lesiones (Scholz and Mittendorf, 2014). El pronóstico es reservado y se caracteriza por inflamación sinovial e hiperplasia, producción de auto-anticuerpos (factor reumatoide y anticuerpo proteico anticitrulinado (ACPA), formación de pannus (proliferación anormal de sinovio) (Chen *et al.*, 2013), destrucción de cartílago y hueso (deformidad) y alteraciones sistémicas que incluyen: desórdenes pulmonares, cardiovasculares, psicológicos y esqueléticos (Di Paola & Cuzzocrea, 2008; McInnes & Schett, 2011). La terapia farmacológica en esta enfermedad se utiliza con el objetivo de aliviar los síntomas, modificar el proceso o aliviar el proceso de la enfermedad. Los medicamentos utilizados son principalmente: Antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides, fármacos antirreumáticos sintéticos modificadores de la enfermedad y fármacos antirreumáticos biológicos modificadores de la enfermedad. Estos últimos pueden ser específicos para algunos de los mediadores del proceso artrítico como son: Factor de Necrosis Tumoral, antagonistas receptores de interleucina 1, moduladores selectivos de coestimulación de células T, etc. (Kaufmann *et al.*, 2013).

Los modelos animales en enfermedades inflamatorias de tipo autoinmune se convierten en una herramienta de valor diagnóstico que permite a los investigadores estudiar sobre la etiología, patología y nuevas estrategias terapéuticas. Teniendo en cuenta que algunos modelos se desarrollan considerando componentes inmunes o genéticos, es necesario tener en cuenta las principales diferencias con la enfermedad en humanos a fin de realizar la extrapolación de los datos obtenidos en animales al entorno clínico humano y determinar posibles actividades terapéuticas de las sustancias a evaluar (Hall & Cooke, 2011). Estos modelos animales pueden clasificarse como: espontáneos, aquellos en los cuales la enfermedad ya se encuentra definida por el acervo genético; y los modelos inducidos, en los cuales la enfermedad se desarrolla por exposición a antígenos, adyuvantes u otros reactivos ya definidos (Hall & Cooke, 2011).

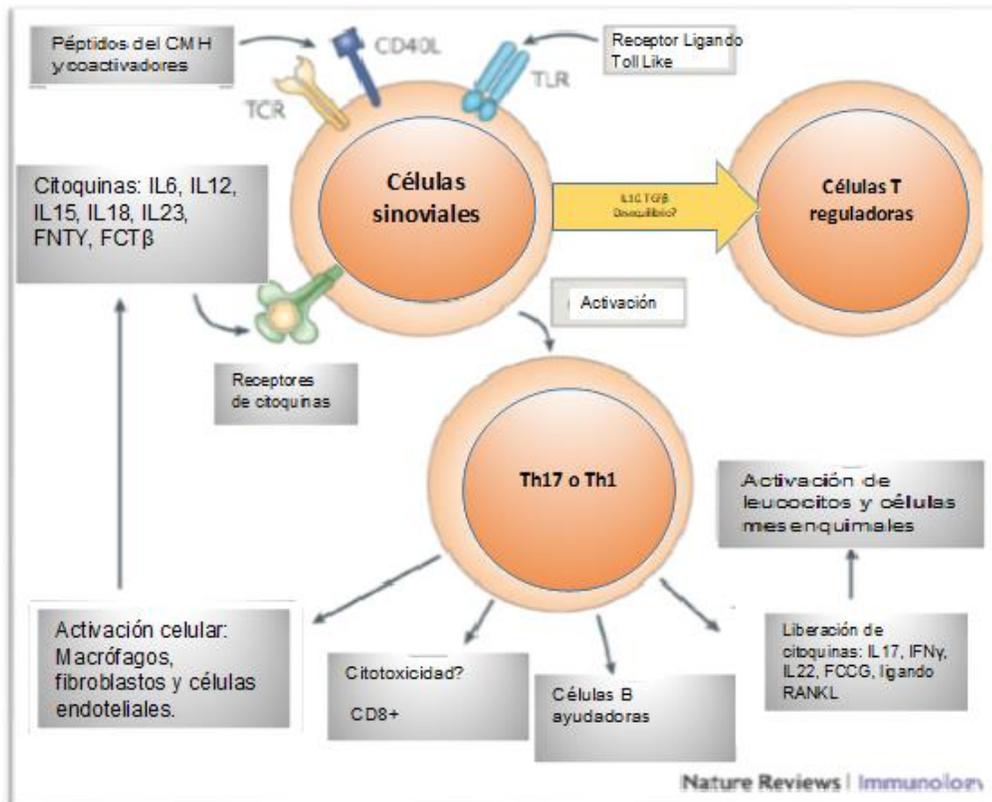
Marco teórico

1.1 Inflamación.

La inflamación es un proceso biológico fundamental que incluye condiciones de tipo agudo y crónico para restaurar las funciones normales de los tejidos, razón por la cual una compleja red inflamatoria que al no controlarse y estar constituida por elementos celulares y humorales, puede desencadenar enfermedades como infarto del miocardio, diabetes, artritis reumatoide, sepsis, cáncer o Alzheimer (Lugrin *et al.*, 2014) (Ahmed *et al.*, 2018). Inicialmente el proceso inflamatorio recluta leucocitos que inician la migración de polimorfonucleares al tejido injuriado, posteriormente se involucran los monocitos que localmente se diferencian en macrófagos (Lawrence & Gilroy, 2007), que liberan a su vez los mediadores inflamatorios entre ellos, el óxido nítrico a partir de la óxido nítrico sintetasa (Sharma *et al.*, 2007). La resolución de la inflamación está supeditada por la eliminación de la injuria, la cual una vez lograda da como resultado una serie de señales que inactivan las citocinas inflamatorias, de lo contrario, si no hay balance entre las sustancias reguladoras y proinflamatorias se pasa a la etapa crónica de la inflamación (Lawrence & Gilroy, 2007; Sokolove & Lepus, 2013). La inflamación originada por causa autoinmune se encuentra afectada por factores intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos se relacionan con los procesos angiogénicos relacionados con la artritis y los extrínsecos son los que refieren los aspectos cualicuantitativos expresados por el tejido linfóide periférico de drenaje, el cual no es capaz de actuar en el sitio donde se ubica el antígeno causante de la reacción inmune (Astry *et al.*, 2013).

La inflamación se caracteriza por la movilización de proteínas séricas y leucocitos de la sangre al tejido extravascular. Existen varios mediadores entre los que se incluyen aminas vasoactivas, histamina, especies reactivas de oxígeno, moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular-1, molécula de adhesión vascular-1, selectinas, lípidos derivados de los eicosanoides, prostaglandina E₂, factor de necrosis tumoral α , Interleucina 1 β , Interleucina 6, Interleucina 10, Interleucina 17, entre otros (Palozza *et al.*, 2010). A continuación, la figura 1-1 incluye los eventos que suceden a nivel de producción de mediadores al estimular la respuesta inmune.

Figura. 1-1 Producción de mediadores en la respuesta inmune. Las células T sinoviales son activadas mediante receptores T (TCR) o receptores de citoquinas "Toll-like". Las interleuquinas 12 (IL-12), IL-23, IL-6 junto con el factor β transformante del crecimiento promueven la diferenciación celular de las células TH1 y TH17. Las células T reguladoras están presentes en las articulaciones en alto porcentaje. Una vez activadas, las células T promueven la liberación de citoquinas, liberación de leucocitos y activación de células mesenquimales a través de la producción de linfocitos B, y en el caso de CD8+ la actividad citotóxica. La activación de los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales se realiza en forma directa a la membrana celular. La activación del complejo mayor de histocompatibilidad se realiza a través de los péptidos CD40L, CD40 ligando; factor estimulante de colonia de granulocitos GM-CSF; receptor activador del factor nuclear κ B (RANK); IFN γ , interferon- γ ; TNF, factor de necrosis tumoral (McInnes & Schett, 2007).

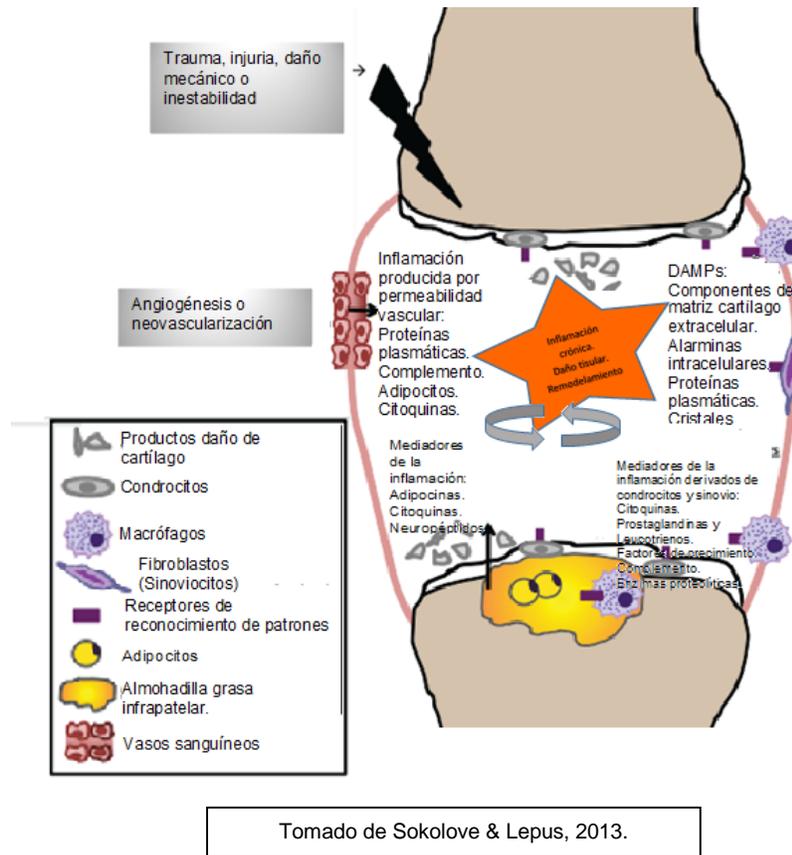


1.2 Artritis reumatoide.

Enfermedad crónica, sistémica y de origen no aclarado, que se caracteriza por tener un componente de tipo autoinmune, el cual puede ser desencadenado por factores genéticos y ambientales (McInnes & Schett, 2011). La clasificación del estado de la enfermedad puede basarse en la presencia/ausencia de autoanticuerpos específicos para autoantígenos modificados por citrulinación y autoanticuerpos frente al factor reumatoideo (Fracción Fc de la Inmunoglobulina G), un resultado positivo indica que el paciente es diagnosticado con artritis reumatoidea por seropositividad, cuadro que se ve en dos tercios de los pacientes afectados con artritis reumatoidea, que responden en forma positiva a una terapia inmunológica (Malmström *et al.*, 2017.).

Clínicamente se observa inflamación crónica e hiperplasia sinovial, que resulta en destrucción de cartílago y hueso (Bevaart *et al.*, 2010). Estudios de tipo molecular han expuesto que cuando se presentan alteraciones a nivel de células T, la actividad de presentación de antígeno se ve afectada dando lugar a una reacción inmune autorreactiva que genera formación de pannus o proliferación anormal de sinovio, necrosis de cartílago y hueso articular (Bevaart *et al.*, 2010). Desde el punto de vista inmunológico el cuadro de artritis reumatoide se caracteriza por una sobreexpresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, por la presencia de moléculas proinflamatorias y / o regulatorias como citocinas (IL1, IL6, IL10, IL13, IL15 e IL18), factores de crecimiento, TNF α , Factor estimulante de colonias de granulocitos - GCSF, quimioquinas, quimiotácticos, proteínas-monocitos quimioatrayentes. El papel de los macrófagos se ha demostrado a nivel del inicio de la cascada inflamatoria y en la amplificación local y sistémica de la inflamación (Raimund *et al.*, 2000; Burmester *et al.*, 2014). A continuación, en la figura 1-2 se esquematiza el desarrollo de este tipo de inflamaciones crónicas.

Figura. 1-2: Papel de la inflamación en osteoartritis. La activación del sistema inmune media la producción de mediadores inflamatorios que perpetúan el proceso inflamatoria y resultan en daño tisular, neovascularización, proliferación de la población celular y remodelamiento óseo . (Sokolove & Lepus, 2013).



La patogénesis de la artritis reumatoide se encuentra dividida en cuatro fases:

- **Fase de inducción.** Se caracteriza por la presencia de una injuria, agente tóxico o infección con activación del sistema inmune innato, promoviendo el desarrollo de la cascada inflamatoria. A nivel de articulación se generan las proteínas citrulinadas que mediante diferentes vías y señales reclutan a monocitos, macrófagos, células sinoviales y fibroblastos dando lugar a la producción de citocinas proinflamatorias (Loannou *et al.*, 2013; Derksen *et al.*, 2017)

- **Fase de inflamación.** Se caracteriza por la activación de células T y B así como la formación de centros germinales en tejido sinovial. Las células T del sinovio son las Th1, que reclutan los mediadores de inflamación que a su vez llevan a la perpetuación de la inflamación (Imran, 2012).
- **Fase de perpetuación.** En esta etapa hay generación de autoanticuerpos contra los anticuerpos presentes en el cartílago y formación de pannus, lo cual origina destrucción del cartílago. En ocasiones se han llegado a identificar auto anticuerpos contra proteínas citrulinadas (Spoerl *et al.*, 2013).
- **Fase de Destrucción.** Ocasionada principalmente por el aumento en TNF α e IL6, que al activar los fibroblastos sinoviales, las células dendríticas, las citocinas proinflamatorias dan lugar a la destrucción de la articulación (cartílago, hueso). (Blanco *et al.*, 2008).

En el tratamiento de la artritis crónica se han utilizado los glucocorticoides que basan su mecanismo de acción en suprimir la producción de inmunoglobulina G a partir de las células B y las citoquinas de linfocitos y activación de células T ayudadoras, la liberación de células mesenquimales y la diferenciación de osteoblastos reduciendo la lesión a nivel óseo (Baschant *et al.*, 2012)

1.2.1 Modelos animales en inflamación crónica (artritis reumatoidea)

Estos modelos son utilizados extensivamente en investigación, buscan no solamente reproducir el cuadro clínico de la enfermedad sino la posibilidad de estudiar y desarrollar moléculas que busquen actuar sobre los diferentes mecanismos patológicos involucrados, deben tener las cualidades de poder ser reproducibles, de fácil ejecución, una duración del biomodelo que permita predecir los datos en humanos y reproducir en forma similar (componente inmune) el cuadro patológico (Bendele, 2001; Webb, 2014). Una de las desventajas que se ha observado en estos modelos es que tienden a ser agudos y en algunos casos el cuadro se revierte e impide estudios y parametrizaciones completas, al igual que no siempre se puede realizar la extrapolación de datos al humano. A pesar que muchos factores (genéticos o ambientales) no se han aclarado del todo, estos biomodelos

sirven para estudiar el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas que pueden llegar a ejercer actividad sobre las sustancias liberadas o sobre los procesos en los cuales tienen influencia, abordando con ello la evaluación de unas determinadas características como: desarrollo de erosión articular, infiltración celular, producción de citocinas y proliferación celular (Holmdalh *et al.*, 2001; Moudgil *et al.*, 2011; Webb, 2014; Whiteside *et al.*, 2013). En la siguiente tabla se relacionan los modelos animales y se incluye el posible mecanismo por el que se obtiene el cuadro artrítico en roedores.

Tabla. 1-1: Principales modelos de roedores utilizados para inducir artritis. (Moudgil *et al.*, 2011).

Denominación del modelo	Especie	Artritogénicos	Mecanismo inmune
MODELOS INDUCIDOS			
Artritis inducida por adyuvante	Rata	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> inactivado por calor	Vía células T.
Artritis inducida por antígeno	Ratón /Rata	Albúmina sérica bovina metilada	Vía células T.
Artritis inducida por Avridina	Rata	Avridina (CP20961)	Vía células T.
Artritis inducida por colágeno	Ratón /Rata	Colágeno tipo II	Vía anticuerpos células T.
Artritis inducida por Isomerasa Glucosa 6P	Ratón	Isomerasa Glucosa 6P	Desconocido. Similar al anticuerpo.
Artritis mediada por complejo inmune	Ratón	Complejo antígeno-anticuerpo	--
Artritis inducida por pristane	Ratón /Rata	Pristane	Vía células T.
Artritis inducida por proteoglicano	Ratón	Proteoglicano de cartílago.	Vía células T.
Artritis inducida por pared celular de <i>Estreptococo</i>	Rata	<i>Estreptococo</i> grupo A/B/C	Vía células T.
MODELOS ESPONTÁNEOS			
Knockout, antagonista de IL-1	Ratón	Deficiencia genética de IL-1Ra	Vía células T.
Knockin IL-6R	Ratón	Mutación genética en punto de mutación GP130, sobreexpresión de IL-6.	Vía células T.
Knockout inducible Jun	Ratón	Delección Jun B y Jun C, incrementando la producción de quimocinas.	Desconocido.
K/BXN	Ratón	Autoanticuerpos reactivos contra Glucosa 6P Isomerasa.	Vía anticuerpos.
SKG	Ratón	Mutación que genera defecto en la diferenciación de células T del timo.	Vía células T
TNF α Transgénico.	Ratón	Incremento en la producción de TNF α	Vía TNF α .
TS1XHACII	Ratón	Modificación en la especificidad del receptor de la célula T CD4+ de hemaglutinina de Influenza.	Desconocido.

1.2.2 Artritis inducida por colágeno (AIC) en ratas.

El biomodelo fue inicialmente desarrollado en ratas Wistar, ratas endocriadas DA (Dark Agouti) DA, Sprague-Dawley, ratas cepa BB y Wistar-Lewis, luego de administrar un inmunógeno como sustancias homólogas o heterólogas de colágeno tipo II (Lorentzen *et al.*, 1995). La AIC es inducida por la administración de sustancias heterólogas de colágeno tipo II emulsificado en adyuvante incompleto de Freund por vía intradérmica, a nivel de la cola o lomo del animal con repetición entre los 10 a 14 días después de la primera inyección. Una manera de evaluar su desarrollo es disponer de una escala que permita la visualización de algunas características de la inflamación, sin embargo, para ello se requiere de más de un observador, dado el carácter subjetivo de la prueba, este sistema de calificación macroscópico tiene en cuenta cuatro niveles de desarrollo del cuadro así: 0: No hay lesiones visibles, 1: Inflamación y enrojecimiento de una articulación; 2: Dos articulaciones involucradas; 3: Más de dos articulaciones afectadas y 4: Severa artritis generalizada (Cuzzocrea *et al.*, 2005). La poliartritis resultante es presentada dos semanas después de la administración del colágeno y se caracteriza por una marcada destrucción del cartílago, acumulación de complejo inmune en la superficie articular, resorción ósea, moderada a marcada sinovitis (Bendele, 2001). Es un modelo animal de inducción, fundamentado en la respuesta inmune al colágeno tipo II administrado, el complejo antígeno-anticuerpo reacciona con el complemento generando la artritis. Se observa mayor susceptibilidad en machos y está regulado genéticamente por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH) y producción del factor reumatoide (Bevaart *et al.*, 2010). Adicionalmente, se enfoca principalmente en la vía de los eicosanoides y en particular en los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX 1 y COX 2) (Webb, 2014).

Inicialmente el líquido sinovial se caracteriza por ser acelular, la administración de colágeno estimula la agregación celular más específicamente en células T, células B, macrófagos y neutrófilos. Las células T interactúan con las células presentadoras del antígeno (CD4) para formar los complejos; adicionalmente se ha demostrado que ratas sin timo son resistentes a la inducción de artritis (Bevaart *et al.*, 2010). Las células B se encargan de la producción de anticuerpos, los cuales se depositan como complejo con el antígeno en la superficie articular interactuando con el complemento. En este caso a nivel plasmático las plaquetas expresan los receptores de colágeno que se denominan

glicoproteína VI y receptor común Fc de la cadena γ , estos receptores son inductores de las micropartículas de las plaquetas que activan sinoviocitos similares a fibroblastos estimulando la producción de interleucina 1, la cual es una citocina que amplifica la inflamación (Ioannou *et al.*, 2013). La interleucina 1β junto con el TNF- α , se caracterizan por aumentar sus niveles en fases más tardías (Inflamación crónica), mientras la interleucina 6 lo hace en la fase inicial del modelo (Ferraccioli *et al.*, 2010).

1.2.3 Artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones.

Se puede realizar en líneas DBA/A inyectando intradérmicamente colágeno bovino tipo II en adyuvante incompleto de Freund, siendo necesaria una segunda inyección con colágeno a los 21 días para la presentación de artritis, la cual afecta principalmente las articulaciones posteriores. Cabe resaltar que en este caso la reacción inmune del ratón la realiza contra el colágeno, situación que no sucede en humanos y el cuadro artrítico es severo. También se ha utilizado en cepas de ratones C57BL/6, en este modelo se realizan inyecciones intradérmicas de colágeno tipo II de pollo al día cero y 21, esta artritis se caracteriza por ser menos severa, comparada con la observada en la AIC inducida en ratones DBA/1. La diferencia entre estos animales modificados genéticamente es su haplotipo el H-2^a de los ratones DBA/1 contra el H-2^b de los C57BL/6 (Bevaart *et al.*, 2010 ; Inglis *et al.*, 2007).

1.2.4 Artritis inducida por adyuvante en ratas.

Se basa en la administración intradérmica de un agente inmunógeno compuesto de una mezcla de aceite mineral, micobacterias inactivadas por calor y/o un agente emulsificante, este agente se llama adyuvante completo de Freund (CFA) (Webb, 2014). Se utilizan ratas DA o LEW, cepas endocriadas DA o LEWIS, la dosis de adyuvante corresponde a 10 mg/mL, vía intradérmica, la generación de artritis se presenta entre los 10 a 14 días después de la inyección por infiltración de leucocitos, destrucción de cartilago y erosión de la superficie articular (Di Paola & Cuzzocrea, 2008). En algunos casos puede suplementarse el adyuvante con sustancias como *Mycobacterium*, adyuvante sintético N-

N Dioctyldecyl-N', N-Bis 2-hidroxi-etilpropanediamine (Bendele, 2001). Este modelo se fundamenta en la sobreestimulación de la respuesta inmune generada por el *Mycobacterium*, incrementando la actividad de Th1 y Th7. La principal función de las células Th1 es la producción de macrófagos, sin embargo, también secreta sustancias como interferon γ , TNF- α e Interleucina-7 (Ahmad *et al.*, 2013). En este caso el inmunógeno que es el *Mycobacterium* genera a partir del día 7 la proliferación de interleucina 6. Desde el día 11 se observa proliferación de TNF- α a nivel de la membrana sinovial y para el día 18 se aumenta la producción de macrófagos. Los macrófagos junto con los monocitos y células dendríticas generan interleucina 1 β , la cual se ha encontrado en altos niveles en enfermedades autoinflamatorias (artritis reumatoide) y es activa solamente cuando es clivada por la enzima proteasa Caspasa 1 que se activa por parte de los inflamomas (Dinarello *et al.*, 2012). Este modelo genera una artritis dependiente de células T (Billiau & Matthys, 2011).

1.2.5 Artritis inducida por Avridina.

La Avridina es considerada un adyuvante sintético no inmunogénico, denominado [(N,N-dioctadecyl-N',N'-bis (2-hydroxyethyl)propanediamine)]. El mecanismo por el cual induce artritis en ratas es similar al ocasionado por la administración de colágeno y/o adyuvante de Freund. Este modelo utiliza ratas o ratones con susceptibilidad genética y se basa en la administración intradérmica de Avridina solubilizada en adyuvante incompleto de Freund (Jonsson, 1995; Naik & Wala, 2014).

1.2.6 Artritis inducida por administración de endotoxina bacteriana en ratas.

Este método utiliza ratas hembras Wistar a las cuales se les administra vía intraarticular polímero de polisacáridos peptidoglicanos de *Streptococcus pyogenes* tipo 3 cepa D-58, una segunda inyección de la sustancia es aplicada vía intravenosa 1 a 8 semanas, resultando en una inflamación crónica severa. La prueba se fundamenta en la actividad de la interleucina 1 sobre el desarrollo de la inflamación aguda y la activación de la interleucina 1 α y 1 β reactivando la inflamación y realizando la transición a su cronicidad (John & Thompson, 1991). A nivel articular el óxido nítrico (NO) es un mediador proinflamatorio. En el fluido sinovial de artritis reumatoide se observa un aumento de nitrotirosina, la cual se

forma de la reacción de oxinitrato con tirosina en fibroblastos sinoviales, sinoviocitos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y membrana sinovial (Sharma *et al.*, 2007).

Normalmente el NO tiene como función la de proteger la integridad del hueso evitando su resorción y daño, un aumento estimula la resorción ósea, disminución en la proliferación y apoptosis de condrocitos (Sharma *et al.*, 2007; Ziskoven *et al.*, 2011). Lo anterior se relaciona porque el aumento de NO junto con mediadores como TNF y la interleucina 1 afecta directamente el ADN mitocondrial ocasionando apoptosis de los condrocitos funcionales (Sharma *et al.*, 2007). La administración de los lipopolisacáridos induce la expresión de óxido nítrico sintetasa (iNOS) la cual estimula la producción de NO, la inflamación resultante hace que los leucocitos polimorfonucleares generen y liberen especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) en las cuales se incluye el NO (Wu *et al.*, 2006; García *et al.*, 2013).

1.2.7 Artritis inducida por albúmina sérica bovina.

En este modelo, el animal es previamente sensibilizado mediante inyecciones intradérmicas o subcutáneas de una sustancia inmunógena como la albúmina sérica bovina metilada, la cual se une al cartílago cargado negativamente, quedando retenida en este tejido. Una segunda dosis estimula la respuesta inmune del animal sensibilizado formando complejo antígeno (cargado positivamente) y el anticuerpo, en la denominada reacción de Arthus. El modelo ha utilizado ratones de la cepa BALB/C 1 (Bendele, 2001)

Enfoque de la investigación.

Teniendo en cuenta que para estudiar moléculas que se propongan como alternativas terapéuticas es necesaria la evaluación en etapa preclínica, se han realizado varios trabajos de investigación que en sus conclusiones recomiendan la necesidad de continuar con el diseño de modelos animales de inflamación crónica que permitan evaluar sustancias con potencial antiinflamatorio como alternativas terapéuticas (González *et al.*, 2007), es claro que no hay disponible un modelo de inflamación crónica, por lo que se impide evidenciar la posible actividad de los extractos promisorios para el tratamiento de inflamaciones de tipo crónico autoinmune.

Para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general: Ampliar las herramientas de investigación experimental mediante la implementación de un modelo de artritis en pequeños roedores para el estudio de principios activos antiinflamatorios.

- **Objetivos específicos:**
- Seleccionar condiciones para la viabilidad de un modelo de artritis en ratas o ratones de laboratorio.
- Caracterizar en el modelo animal de artritis seleccionado parámetros fisiopatológicos y algunos marcadores bioquímicos.
- Evaluar en los animales artríticos el comportamiento de diferentes sustancias patrón con actividad antiinflamatoria.

Materiales y métodos.

3.1 Animales de experimentación. Aspectos éticos.

El estudio utilizó hembras Wistar de 13 semanas de edad, con un peso entre 170 a 200 g y edades entre 10 y 13 semanas.

Los ensayos propuestos para la formulación del modelo se sometieron a aprobación al Comité de Ética de la Facultad de Ciencias (Acta 01 de 2015) y siguieron los lineamientos contenidos en el protocolo “Utilización de Animales de Laboratorio en la Experimentación Biológica”. El manejo de los animales tendrá en cuenta los principios éticos establecidos en la normatividad colombiana: Ley 84 de 1989 *“Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia”* y Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud Pública, del 4 de Octubre de 1993 *“Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.(TítuloV)”*. Para el manejo de los animales el investigador debe someterse a capacitación con el fin de evitar dolor o estrés innecesario al animal.

3.2 Reactivos.

- Adyuvante completo de Freund (1mg/mL, Sigma F5881).
- Colágeno tipo II (5mg/mL) en ácido acético 0,05 M obtenida a partir de anillos de tráquea de bovinos en el Laboratorio del “Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos” (COL0011106) de la Universidad Nacional de Colombia.
- Dexametasona fosfato (4mg/mL).
- Estándar Albúmina sérica bovina (BSA Sigma B2518) 1 mg/mL.
- Solución de ácido bicinconínico (BCA Sigma B9643).
- Sulfato de cobre en solución 4% p/v.
- Tetrametoxipropano (TMP Sigma 108383).
- Ácido tricloroacético (TCA Merck).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA Sigma T5500)

3.3 Materiales y equipos.

- Caliper digital. Kanon EMS6 (0,01-25mm).
- Calibrador micrométrico NSK modelo JIS B7502
- Pipeta Select BioProducts monocanal de capacidad 200 µl -1000 µl.
- Pipeta Select BioProducts monocanal 5 µl -50 µl.
- Microplaca fondo plano de 96 pozos TPP.
- Lector de placas BIORAD,(xMark microplate manager® 6 software)
- Polytron PT2100 Kinematica AG.
- Agitador de tubos.
- Centrifuga refrigerada eppendorf rotor fijo para tubos de 1.5 mL.
- LUMINEX MAGPIX (Sistema para la identificación y cuantificación de proteínas a partir de la lectura de la intensidad de la reacción antígeno anticuerpo) con xPONENT software
- Congelador de -20 °C.
- Balanza Ohaus con canastilla para pesar animales.
- Pletismómetro Ugo Basile modelo 7140.
- Generador de rayos X Polymat 30/50 Siemens.
- Digitalizador AGFA CR30-X.
- Elementos para alojamiento y cuidado de los animales (Cajas metálicas, botella para agua de bebida).
- Alimento peletizado para ratas (LabDiet referencia 5010).

3.4 Determinación de proteínas (Ácido bicinonínico).

Esta prueba se fundamenta en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas, también es llamada reacción de Biuret. El ácido bicinonínico (BCA), es un reactivo cromogénico que reacciona en forma específica con el Cu^{1+} , es así, que dos moléculas de BCA reaccionan con una molécula de Cu^{1+} . La cantidad de cobre reducido se encuentra en función de la cantidad de proteína presente en la muestra, y para cuantificar esta cantidad se utiliza el espectrofotómetro, ya que la reacción se visualiza cuando la solución vira de un color azul a púrpura (absorbancia 562 nm), encontrando que la absorbancia es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución, para ello se requiere tener

una solución estándar de proteína, generalmente la Albúmina Sérica Bovina. El manejo de los tejidos y desarrollo de la prueba se relaciona en el anexo A.

3.5 Determinación de Interleucinas.

Se ha demostrado que la activación de las células T, la infiltración de neutrófilos y la angiogénesis se relacionan con la patogénesis de la destrucción de la articulación (Firestein, 2003; Chen *et al.*, 2013). En este caso el sinovio inflamado se compone de una diversidad de poblaciones celulares que incluyen entre otras : células B, macrófagos, fibroblastos sinoviales, que dan como consecuencia la perpetuación de la inflamación con respuesta autoinmune a nivel articular, destrucción de hueso, aumento en la población de citocinas proinflamatorias, hiperplasia sinovial y artritis, el daño en este caso es causado por las enzimas metaloproteinasas que degradan la matriz sinovial (Chakraborti *et al.*, 2003; Carolina *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2018). En el proceso de perpetuación de la inflamación están presentes la interleucina 1, interleucina 6, factor de necrosis tumoral, matriz de metaloproteinasas y prostaglandina E2 (Hurlimann, 2002; Firestein, 2003; Kim *et al.*, 2004; McInnes *et al.*, 2007; Balagué *et al.*, 2012). Por lo anterior, determinar la concentración de citocinas proinflamatorias puede convertirse en una herramienta para la evaluación de la progresión del modelo de artritis. Diversos estudios demuestran que los niveles de TNF son mayores en animales artríticos, no sucede lo mismo con la interleucina1 β , la cual puede mantenerse en niveles similares a los animales normales (Khalifeh *et al.*, 2010). Igualmente sucede con la interleucina 10, interleucina 4 y el factor transformante de crecimiento, que se relacionan con la prevención de la exacerbación de la inflamación. Se evidencia un incremento de gamma interferón, Factor de Necrosis Tumoral sobre el día 13 de la inmunización y en etapas tempranas de la inflamación se expresan citocinas como IL1 β , IL4 e IL6, por lo anterior niveles elevados de estas sustancias pueden correlacionarse con los síntomas clínicos de la artritis (Svelander *et al.*, 2001; Waksman, 2002; Chen *et al.*, 2013; Steen-Louws *et al.*, 2019). El desarrollo de inmunoensayos como MILLIPLEX MAP Kit permite la detección múltiple de interleucinas a partir de muestras de suero o homogenados de tejidos. El manejo de los tejidos y desarrollo de la prueba se relaciona en el anexo B.

3.6 Determinación de TBARs.

El estrés oxidativo sobre membranas biológicas desencadena peroxidación lipídica, produciendo moléculas de pequeño tamaño como el malonildialdehído (MDA). Este se constituye en un recurso analítico por representar a las moléculas que reaccionan con el ácido Tiobarbitúrico (TBARs) produciendo aductos coloreados detectables por su absorbancia a 532 nm (Alam *et al.*, 2013).

El MDA se puede originar por la hidrólisis ácida (HCl 0.1 N) del reactivo 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP). El medio de reacción que contiene las muestras biológicas (suero, exudados inflamatorios; etc.) se hace reaccionar en medio ácido (ácido Tricloroacético al 10%) con TBA al 1%, calentando a 90 °C durante 30 minutos. Después de enfriamiento, las muestras de sobrenadante se leen a 532 nm para calcular mediante una curva de calibración la concentración de MDA. La especificación de esta prueba se puede ver en el anexo C.

3.7 Desarrollo del modelo de artritis por adyuvante.

3.7.1 Inducción y tratamiento de la inflamación.

Se realizaron estudios preliminares en cinco animales, lo cual permitió definir que la vía óptima de administración es la intradérmica y no la subcutánea, esto puede deberse a que en la estructura anatómica de la piel de la epidermis en el estrato basal se encuentran las células dendríticas que facilitan la presentación de antígeno a través de la corriente sanguínea, además, que la sustancia artrogénica con el adyuvante permanece por más tiempo en el espacio intradérmico que en subcutáneo, estimulando por mayor tiempo el sistema inmune por la liberación sostenida del antígeno (*Mycobacterium tuberculosis*)(Blanco *et al.*, 2008).

Se seleccionaron 18 ratas hembras, de 13 semanas de edad y peso entre 170 a 200 gramos, para desarrollar la artritis mediante la administración conjunta de Adyuvante Completo de Freund y Colágeno tipo II (Waksman, 2002). La sustancia artrogénica se preparó como una emulsión en proporción 1:1 de Adyuvante completo de Freund (1mg/mL,

Sigma F5881) y Colágeno tipo II (5mg/mL, en ácido acético 0,05 M), esta mezcla se administró en cantidad de 0,3 mL por vía intradérmica y distribuido en tres sitios alrededor de la cola, la dosis final aplicada correspondió a 0,3 mg de Adyuvante Completo de Freund y 1,5 mg de colágeno tipo II, por animal, este proceso se repitió en el día 7. Al día 21 se chequearon los signos clínicos de inflamación (aumento de tamaño de las extremidades, calor, rubor, cojera) y se seleccionaron al azar dos grupos: uno conformado por animales artríticos tratados con dexametasona a dosis de 1mg/Kg, dos veces al día durante diez días y un grupo control sin tratamiento. En la Figura 3-1 se observan las lesiones inflamatorias en patas al día 21 y que permitieron declarar a los animales como “artríticos”.

La selección del fármaco patrón dexametasona se debió a su acción como sustancia antiinflamatoria involucrada en la regulación de la expresión de citocinas en la articulación, inhibición de la proliferación celular y la activación de los neutrófilos (Zhang *et al.*, 2014), por lo que su acción antiinflamatoria ya ha sido estudiada (Vallières & du Souich, 2010; Baschant *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

Los animales se pesaron los días 1, 7, 21 y 35, teniendo en cuenta los tiempos en que se realizan las dos administraciones de emulsión artrogénica y que el tratamiento antiinflamatorio comienza el día 21.

Se tomaron medidas externas de las patas posteriores los días 1, 21 y 35. Las muestras finales de tejidos y sueros se tomaron al día 35, lo que se buscó fue determinar la duración del proceso inflamatorio y la diferencia de los animales administrados con sustancia patrón antiinflamatoria y el proceso natural crónico. Del total de animales administrados con la solución artrogénica (n=18) se tomaron ejemplares para las siguientes pruebas:

- Pruebas radiológicas: Se envió un animal control (artrítico tratado con vehículo) y un animal tratado con dexametasona. Adicionalmente se envió un animal normal (blanco sin ninguna intervención).
- Pruebas histopatológicas: Muestras de una extremidad posterior procedentes de un animal control, un animal tratado con dexametasona, un animal administrado con sustancia artrogénica y que resultó “no reactivo” y un animal normal (blanco sin ninguna intervención).
- Pruebas bioquímicas: La otra extremidad de los animales comentados en el párrafo anterior se utilizó para para evaluar estos parámetros.

Figura. 2-1 Animales artríticos por administración de Adyuvante de Freund y Colágeno tipo II.



3.7.2 Caracterización de la inflamación.

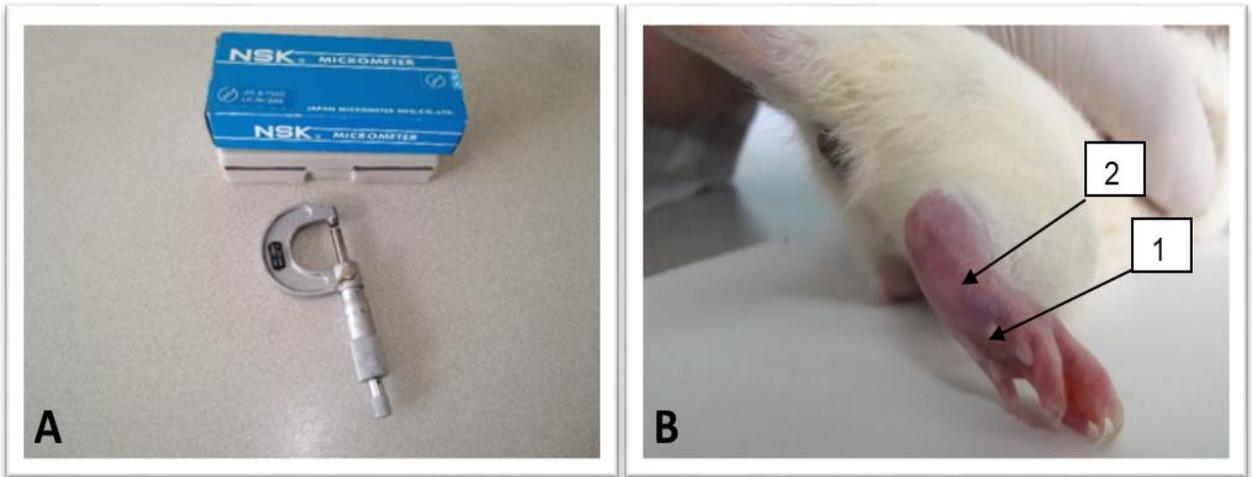
Evolución del peso.

Los días 1, 14, 21 y 35 se determinó el peso de los animales, con el fin de confirmar si entre los animales tratados con la sustancia patrón y los animales controles artríticos existían diferencias significativas.

Medidas anatómicas.

La inflamación desarrollada después del esquema de inmunización se evaluó teniendo en cuenta la siguiente escala de observaciones de las lesiones de tipo clínico: 0, No hay evidencia de inflamación; 1, hiperemia, con inflamación leve o ausente; 2, inflamación restringida al tobillo, leve hiperemia; 3, inflamación incrementada, hiperemia en tobillos, muñecas (articulación tarso metatarsiana) y falanges (región metatarsal) y 4, máxima inflamación e hiperemia (Kimpel *et al.*, 2003; Kannan *et al.*,2005;Fickert *et al.*, 2014). Sin embargo estas observaciones son subjetivas, por lo que se decidió medir el diámetro de la articulación (mm) utilizando un calibrador micrométrico, cada punto anatómico se midió por duplicado (figura 3-2).

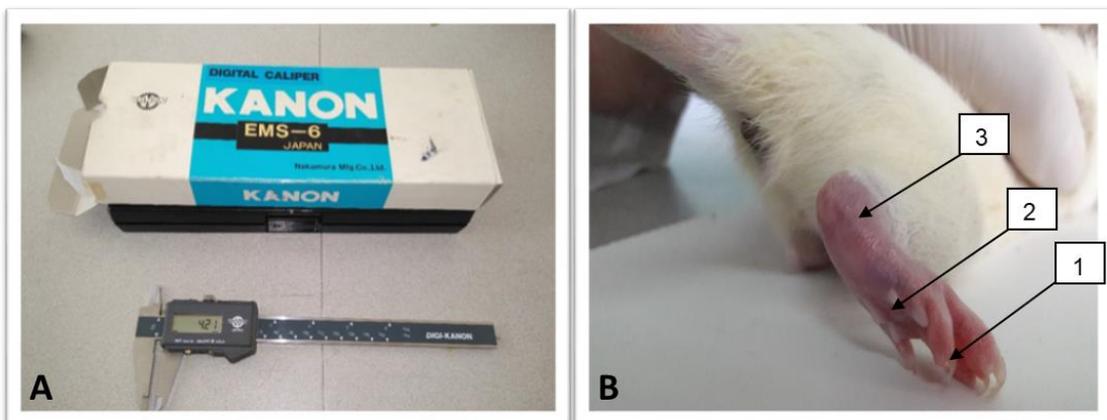
Figura. 3-2 Puntos anatómicos de evaluación con calibrador micrométrico.

**A:** Calibrador micrométrico. **B:** Puntos anatómicos de evaluación, dedos (1), planta (2).

Mediciones externas por caliper digital.

La inflamación o edema de las extremidades se realizó utilizando caliper digital en 3 puntos anatómicos que son: dedos (1), planta de la pata (2) y cóndilos (3), representados en la figura 3-3. Las medidas obtenidas se presentan en mm.

Figura. 3-3 Puntos anatómicos de evaluación con caliper digital.

**A:** Caliper digital. **B:** Puntos anatómicos de evaluación: dedos (1), planta (2), cóndilos (3).

3.7.3 Parámetros bioquímicos.

Al día 35 de la prueba se tomaron muestras de sangre de los animales del grupo control y de los animales del grupo tratado a partir del seno venoso retroorbital. Posteriormente se procedió al sacrificio y se tomaron muestras de tejido (extremidades posteriores) que comprende la articulación tibio-tarsal, tarso-metatarsiana e interfalángicas.

De las muestras de sangre se obtuvo suero a partir del proceso de centrifugación (2500 rpm, 10 min, 4°C) y fueron almacenadas a una temperatura de -20°C. Las muestras de tejido fueron maceradas y homogenizadas según el proceso relacionado en el anexo A., para ser analizadas por el método del ácido Bicinconínico para la cuantificación de proteínas, prueba de TBARs y en la detección de interleucinas. El inmunoensayo MILLIPLEX se fundamenta en detectar un complejo de reacción antígeno (contenido en el homogenado)-anticuerpo (perlas sensibilizadas), el cual se une al conjugado que contiene estreptavidina ficoeritrina y emite una señal fluorescente que determinará la cantidad de interleucinas presentes en cada muestra analizada, previa calibración de la curva de concentración. Mediante esta prueba se cuantificaron IL1 β , IL10, IL6 y TNF α .

3.7.4 Evaluación histopatológica.

La angiogénesis y la formación de pannus juegan un papel esencial en la erosión del cartílago articular y procesos patológicos óseos en la artritis reumatoide (AR) (Chen *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2013). Las muestras analizadas procedieron de secciones completas de articulaciones tibio tarsal y tarso metatarsiano, incluyendo piel y músculo manteniendo intacta la membrana sinovial. El manejo de los animales se muestra en la figura 3-4.

Figura. 3-4 Manejo de animal al momento de la inspección.



Las muestras fijadas en formol fueron descalcificadas por inmersión en ácido nítrico 3% y mantenidas a temperatura ambiente por 7 días, verificando diariamente la consistencia del hueso. Posteriormente las muestras fijadas en formol al 10 % bufferado, se cortaron transversalmente y fueron coloreadas con hematoxilina eosina (HE) para ser evaluadas en microscopio (CX21; Olympus, Tokyo, Japan). La evaluación histopatológica tuvo en cuenta lesiones a nivel celular, óseo y formación de pannus; parámetros que se calificaron según la siguiente escala (Ali *et al.*, 2015):

- **Proliferación sinovial.** Grado 0: no hay proliferación; Grado 1: suave proliferación en dos a cuatro capas de sinoviocitos reactivos; Grado 2: moderada proliferación en las cuatro capas de sinoviocitos reactivos, incremento de la actividad mitótica y suave o ausencia de invasión celular adyacente al hueso y tejido conectivo y Grado 3: severa proliferación caracterizada por invasión del sinovio hiperplásico y desaparición del espacio articular, cartílago adyacente, hueso y tejido conectivo.
- **Infiltración celular.** Grado 0: sin cambios; Grado 1, poca infiltración focal; Grado 2: extensa infiltración focal; Grado 3: extensa infiltración que invade la cápsula articular con formación de agregados.

- **Erosión del cartílago.** Grado 0: no hay cambios visibles; Grado 1: degradación localizada del cartílago en más de una región; Grado 2: degradación profunda y localizada del cartílago; y Grado 3: cartílago con degradación extensa, profunda y en varias zonas.

- **Formación de pannus.** Grado 0: no hay cambios; Grado 1: formación de pannus hasta en dos sitios; Grado 2: formación de pannus hasta en cuatro sitios, con infiltración o sobrecrecimiento en la superficie articular; y Grado 3: formación de pannus en más de cuatro sitios o formación extensa de pannus hasta en dos sitios.

3.7.5 Estudio radiográfico.

Se seleccionó un animal normal (blanco no artrítico), uno artrítico control (sin tratamiento con dexametasona) y uno artrítico tratado (administrado con dexametasona). Los animales fueron sacrificados previamente por dislocación cervical con el propósito de evitar sufrimiento innecesario en la manipulación al momento de las tomas radiográficas. El objetivo de utilizar esta técnica fue evaluar los cambios artríticos, grado de severidad y posible efecto antiinflamatorio de la dexametasona comparando con animales normales. Se utilizó el generador de rayos X Polymat 30/50 Siemens y el digitalizador AGFA CR30-X.

Resultados y Discusión.

4.1 Inducción y tratamiento de la inflamación

Los ensayos preliminares en los que se utilizó una única dosis de adyuvante de Freund, por vía subcutánea, no demostró reproducibilidad en la inflamación, por lo tanto se adopta administrar una emulsión compuesta de adyuvante de Freund + Colágeno tipo II, en volumen final de 0,3 mL y repetición de la inmunización al día 7.

Inicialmente se tomaron medidas de volumen (mL) con el pletismómetro (Ugo Basile) los días 1 y 14, en donde se detectaron con inflamación 5 de 18 de los animales (28%). Debido a que se presentó una falla en el funcionamiento de este equipo, fue necesario utilizar dos aparatos de medición alternos: caliper digital y calibrador micrométrico.

Con el fin de validar este cambio, se tomaron los datos de las mediciones de los animales inflamados al día 14 (5 animales de 18, es decir 28%) y las mismas se comprobaron al día 21, permitiendo una familiarización con los valores que reflejan que existe inflamación. De esta forma, se encontró que muchos más animales ahora presentaban el cuadro artrítico.

Con el calibrador micrométrico se midieron dos puntos anatómicos que permitieron identificar como inflamados 15 animales de 18 cuando se mide en los dedos y 15 animales de 18 cuando se mide en la planta. De otro lado, cuando se utilizó el calibrador digital se identificaron como inflamados 15 animales de 18 cuando se miden los dedos; 15 animales de 18 cuando se mide en la planta y 16 animales de 18 cuando se mide en los cóndilos. Estos resultados se muestran en la Tabla 4-1 y dejan ver que hay una progresión en la inflamación logrando un máximo de 89% de animales inflamados al día 21. Se encontró que los valores de mediciones anatómicas hechas con ambos calibradores permiten identificar los animales inflamados, con valores reproducibles en un rango de medida homogéneo para cada sitio anatómico y para cada equipo de medida. En conclusión, cada equipo por separado es útil para discriminar la inflamación presente o no en los animales del experimento. No se consideró necesario mantener un grupo adicional de animales blanco ya que lo que se busca es reproducir un cuadro de inflamación crónica y caracterizar el proceso patológico.

Tabla. 4-1 Medidas equivalentes en los diferentes equipos.

	PLETISMÓMETRO (mL) DIA 14		CALIBRADOR MICROMÉTRICO (mm) DIA 21				CALIBRADOR DIGITAL (mm) DIA 21					
			DEDOS		PLANTA		DEDOS		PLANTA		CÓNDILOS	
	PATA DER.	PATA IZQ.	PATA DER.	PATA IZQ.	PATA DER.	PATA IZQ.	PATA DER.	PATA IZQ.	PATA DER.	PATA IZQ.	PATA DER.	PATA IZQ.
N (observaciones)	5	5	15	15	15	14	15	15	15	15	16	13
MEDIA	1,43	1,30	5,77	5,62	8,65	8,48	6,47	6,63	8,76	8,94	9,03	8,75
D.E.	0,09	0,17	0,42	0,48	0,38	1,12	1,16	0,83	0,63	1,32	0,44	1,41

4.2 Caracterización de la inflamación.

4.2.1 Evolución del peso.

Los pesos de los animales artríticos tienen una tendencia a disminuir en ambos grupos estudiados, es decir, los animales continúan en el proceso artrítico, sin embargo, el grado de lesión es menor en los animales tratados con dexametasona que en los animales del grupo control, el cual experimentó una pérdida cercana al 14 % al cabo de los 35 días del experimento; mientras grupo tratado con dexametasona solamente sufrió una pérdida de peso cercana al 3% en este mismo período, este comportamiento también ha sido evidenciado en otros estudios similares (Yanzhi *et al.*, 2015; Cuzzocrea *et al.*, 2005). En la tabla 4-2 se puede observar cómo los animales parten con comportamiento similar en cuanto a pérdida de peso, pero una vez iniciado el tratamiento con dexametasona el grupo control sigue perdiendo peso mientras el grupo tratado con antiinflamatorio (Dexametasona) lo recupera debido a la disminución del cuadro clínico.

Tabla. 4-2 Evolución del peso en animales artríticos.

	DIA 1	DIA 14	DIA 21	DIA 35
	Peso (g) (Media +/- D.E)			
CONTROL (n=7)	190 +/- 9	179 +/- 16	173 +/- 21	164 +/- 13
DEXA (n=9)	194 +/- 6	189 +/- 6	184 +/- 4	188 +/- 7*

Control: Animal artrítico no tratado. DEXA: Animal artrítico tratado con dexametasona. Los datos se expresan como la media M +/-DE de los pesos en gramos. "t" Student. *p<0.05(Tratados frente al control).

4.2.2 Medidas anatómicas.

MEDIDAS EXTERNAS.

Calibrador micrométrico.

Los resultados obtenidos en la prueba t suponiendo varianzas iguales, para las medidas con calibrador micrométrico en dedos al día 21, indican que no hay diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado (n=8, con un nivel de significancia de 0,05, el valor de p corresponde a 0,18, por tanto no hay diferencia de varianzas), esto confirma que los animales son artríticos y no hay diferencia entre grupos al momento de la selección. Igual conclusión se obtiene al día 35 (n=8, con un nivel de significancia de 0,05, el valor de p corresponde a 0,06, por tanto no hay diferencia de varianzas).

Al comparar solamente dentro del grupo de animales tratados entre los días 21 y 35, sí se encuentra una diferencia significativa en la medida de planta (n=8, con un nivel de significancia de 0,05, el valor de p corresponde a 0,0015, por tanto se consideran las que las medias son diferentes), lo que refleja que hay un efecto antiinflamatorio con la administración de dexametasona cuando se comparan las mediciones en planta.

De otro lado, cuando se compara internamente el grupo control en los días 21 y 35, no hay diferencia en las medias de la medida de planta, indicando que el proceso inflamatorio crónico continúa y no hay reversión espontánea. Estos datos evidencian que la artritis se establece al día 21 y los animales que conformarán los grupos control y tratado no tienen diferencias significativas en esta valoración.

Al evaluar las medidas en los dedos entre el grupo control y tratado el resultado sobre las medidas en dedos no refleja diferencias en los grupos control y tratado. Sin embargo, en los datos al día 35, si se observó diferencia significativa entre el grupo tratado, esto se explica por la administración con dexametasona y su efecto sobre la inhibición de las citocinas proinflamatorias (Baschant *et al.*, 2012). Los anteriores resultados, se exponen en la Tabla 4-3.

Tabla. 2-3 Comparación de las medidas externas (mm) utilizando Calibrador micrométrico, en grupos control y tratados.

	DEDOS DIA 21	DEDOS DIA 35	PLANTA DIA 21	PLANTA DIA 35
	MEDIA +/- D.E			
CONTROL	5,29 +/- 1,12	5,39 +/- 1,68	7,93 +/- 1,57	7,02 +/- 1,66
TRATADO	5,58 +/- 0,63	4,37 +/- 1,29	8,50 +/- 0,78	5,75 +/- 0,96 *

Los datos se presentan como M+/-DE: *p<0.05 comparación dentro del grupo tratado "t" Student.

Calibrador digital.

Las mediciones realizadas con caliper digital para el punto anatómico dedos no presentan diferencias estadísticamente significativas, lo cual confirma el resultado obtenido con el calibrador micrométrico. En lo que respecta a las comparaciones entre el día 21 y 35 dentro del grupo control, se encontró una diferencia estadísticamente significativa, lo cual refleja que hay un efecto antiinflamatorio con el tratamiento de dexametasona, como se evidencia en la tabla 4-4. Adicionalmente, hay correlación en las medidas obtenidas entre los equipos, tanto en el punto anatómico dedos como en el de planta.

Tabla. 4-4 Comparación de las medidas externas (mm) utilizando caliper digital, en grupo control y tratado.

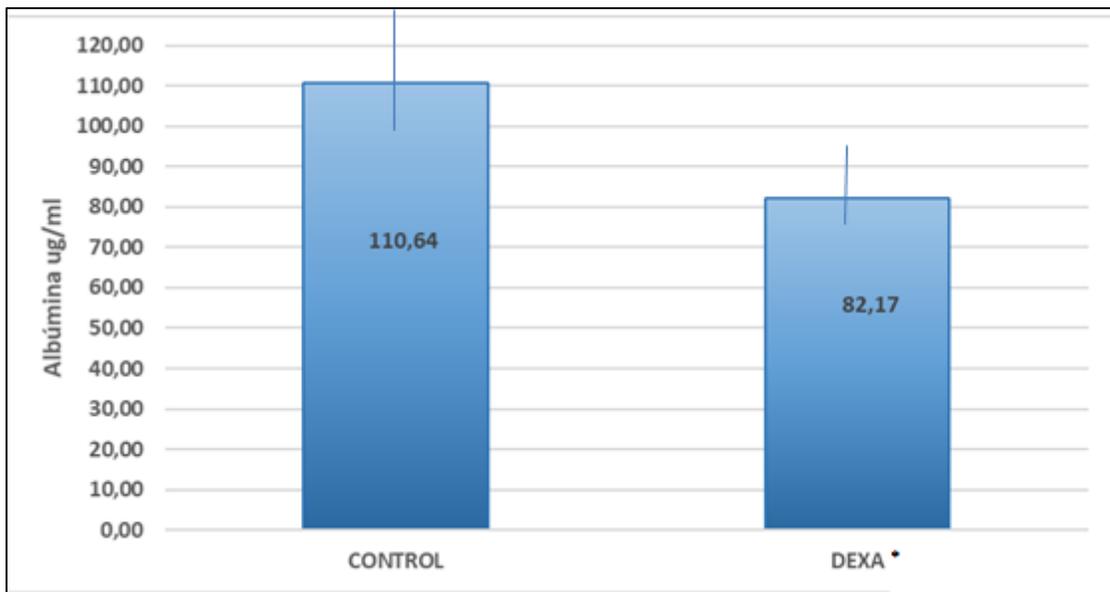
	DEDOS DIA 21	DEDOS DIA 35	PLANTA DIA 21	PLANTA DIA 35	CÓNDILO DIA 21	CÓNDILO DIA 35
	MEDIA +/- D.E					
CONTROL	5,29 +/- 1,84	4,97 +/- 1,69	7,09 +/- 2,27	7,62 +/- 1,11	7,33 +/- 2,11	7,31 +/- 0,89
TRATADO	6,49 +/- 1,43	3,78 +/- 0,86 *	8,75 +/- 0,99	5,82 +/- 0,81 *	8,03 +/- 1,75	6,73 +/- 0,55

* $p < 0.05$, comparación dentro del grupo tratado. ■ *

4.2.3 Parámetros bioquímicos.

- **Cuantificación de proteínas.**

Figura. 4-1 Comparativo concentración de proteínas en animales artríticos .



MEDIA +/- D.E.: Control (110,64 +/- 13,14) ; Tratados* (82,17 +/- 9,16).

* $p < 0.05$ comparación frente al grupo control, "t" Student.

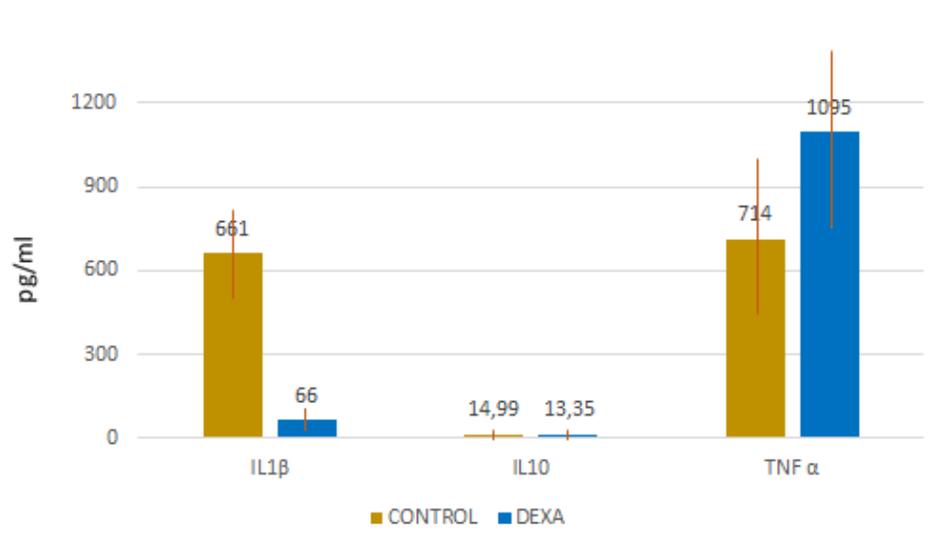
Para la cuantificar la proteína se realizó inicialmente la curva de calibración, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta con los datos obtenidos de cada estándar y su dilución. Una

vez ajustadas las absorbancias, se procede a realizar análisis de regresión y con la ecuación de la recta se llega a determinar la concentración de proteína de cada muestra con respecto a la curva de calibración de los estándares.

Acorde con la prueba t Student se puede concluir que hay diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control, esto en razón a que dentro del mecanismo de acción de la dexametasona está el de interferir con la producción por parte de los monocitos y macrófagos de citoquinas proinflamatorias tipo IL2, IL6 y TNF α ; disminuir la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y receptores Fc (factor reumatoideo), las prostaglandinas, células T, granulocitos y sus efectos sobre células endoteliales reduciendo la permeabilidad vascular, los receptores de moléculas de adhesión celular L-E, la producción de protanglandinas, la producción de IL1 y la proliferación de fibroblastos (Stahn *et al.*, 2007).

▪ **Cuantificación de IL1 β , IL10, TNF α .**

Figura. 4-2 Perfiles de interleucina IL1 β , IL10, TNF α en grupos control y tratado.



	CONTROL	DEXA
IL1β	661 +/- 121	66 +/- 17 (*)
IL10	14,99 +/- 7,44	13,35 +/- 7,66
TNF α	714 +/- 232	1095 +/- 300
*p<0.05 (frente al control), "t" Student.		

Los resultados obtenidos de las muestras de homogenados de patas destacan que la única interleucina en donde se puede evidenciar diferencia significativa en el grupo tratado y el grupo control es la interleucina 1 β , la cual se caracteriza por estar presente en cuadros de inflamación severa crónica, especialmente en aquellas inflamaciones con un componente inmune en donde hay activación de las células T ayudadoras (Stünkel *et al.*, 1988). Además, se ha comprobado que es la principal citocina en la patogénesis de la artritis reumatoidea al promover la producción de otras citocinas proinflamatorias y su producción se encuentra aumentada en los procesos artríticos (Chu *et al.*, 2007; Zhao & Liu, 2012; Westlund *et al.*, 2018). La IL10 se observa principalmente en cuadros que favorecen la actividad humoral, estimulación de la inflamación y destrucción ósea (Lorenzo *et al.*, 2012). Con respecto a los hallazgos de IL10 y TNF α , las cuales modulan las células T ayudadoras tipo 1, puede concluirse que al no haber diferencias significativas entre los grupos Control (animales artríticos) y Tratados (animales artríticos tratados con dexametasona) los animales por si mismos pueden estar reversando el cuadro inflamatorio a pesar de la cronicidad del mismo y que el efecto regulador de estas interleucinas esté modulando las células CD4 y CD25 (Lorenzo *et al.*, 2012), adicionalmente pueden verse valores mayores de TNF α con respecto a IL10, lo cual corrobora lo observado por Dominguez, en donde evidencian que altos niveles de TNF α reflejan niveles menores de IL10 (Dominguez *et al.*, 2008).

Aunque se ha referenciado una fuerte asociación entre IL1 β e IL6 (Lorenzo *et al.*, 2012), en nuestro ensayo no se detectó IL6 en ninguna de las muestras analizadas, posiblemente no hubo buena recuperación de perlas sensibilizadas con antígenos de IL6, debido al bajo nivel de complejo antígeno-anticuerpo en la muestra, sin embargo, esta proteína proinflamatoria debe ser estudiada con mayor profundidad dado el papel que juega en la severidad de la artritis, pues se ha demostrado en ratones que extractos de *Olx subscorpiodea* afectan directamente la activación de IL6 que se refleja en que la artritis no se desarrolla con la misma severidad (Ezeani *et al.*, 2019). Lo anterior no quiere decir que se deba demeritar nuestro ensayo, ya que el rango de lectura de los estándares de la prueba fueron satisfactorios (curva de calibración de ILs) pero los niveles de IL6 en nuestras muestras biológicas no fueron detectables.

- **Peroxidación lipídica (Ensayo TBARs).** Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

Tabla. 4-5 Concentración MDA en tejidos de animales artríticos.

	CONTROL 1	TRATADO 1	CONTROL 2	TRATADO 2
	nMol /mg proteína		nMol /g de tejido	
MEDIA +/- D.E	18 +/- 4	16 +/- 5	7,79 +/- 2,25	5 +/- 1,43 *
*p<0,05. "t" Student (frente al control).				

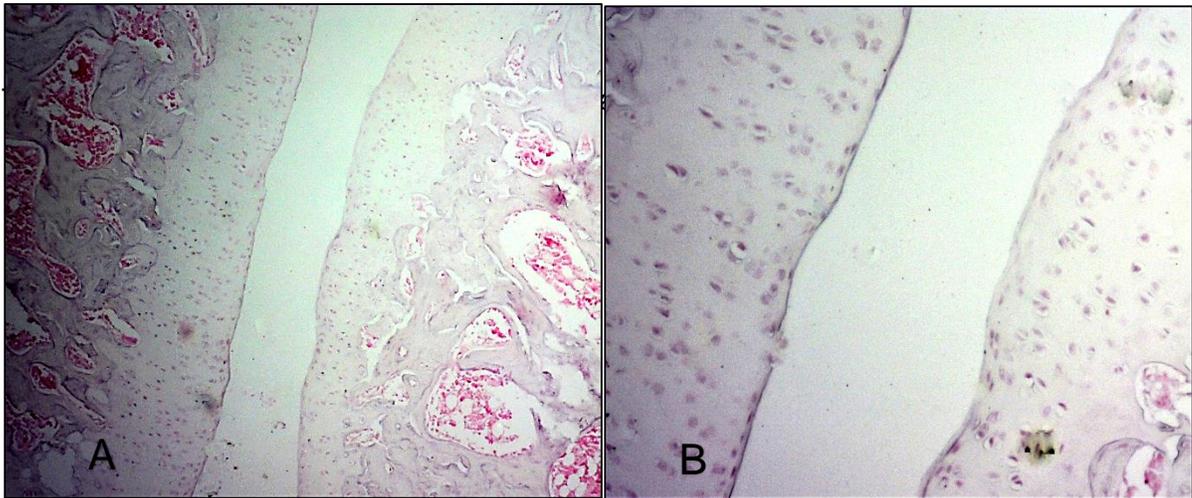
El resultado obtenido en tejidos indica que en los animales tratados el estrés oxidativo de los tejidos disminuyó con la administración de la dexametasona. En las muestras de animales control hay mayor concentración de células apoptóticas, residuos de membranas celular, otro tipo de lipoproteínas que reflejan la acumulación de detritus y presencia de enzimas que aumentan cuando se supera la capacidad antioxidante del organismo (Lugrin *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016); por lo anterior se explica un mayor contenido de MDA en este grupo de animales.

4.2.4 Evaluación histopatológica.

La escala para evaluar el proceso artrítico que se utilizó en el presente trabajo se basó en el sistema de clasificación que tiene en cuenta aspectos como: proliferación sinovial, infiltración celular, erosión de cartílago y formación de pannus (Ali *et al.*, 2015). Las muestras seleccionadas para esta evaluación fueron tejidos procedentes de animal no administrado con sustancias artrogénicas (animal normal), animal administrado con adyuvante y colágeno tipo II que no respondió a la inmunización (animal no reactivo), animal artrítico sin tratamiento (animal control) y animal artrítico tratado con dexametasona (animal tratado). El animal normal y el no reactivo en general no manifiestan lesiones a nivel de sinovio, infiltración celular, erosión de cartílago o formación de pannus. En relación con los animales control todos exponen lesiones de grado 3 que incluyen proliferación celular severa del sinovio, actividad de sinoviocitos, infiltración mixta severa, con erosión del cartílago y desarrollo de pannus. Los animales tratados con dexametasona presentan diversos grados de lesión proliferativa (grado 1 a 3), sin infiltración celular, moderada erosión del cartílago en el mismo animal que no desarrolló pannus. Estos hallazgos

permiten evidenciar la respuesta antiinflamatoria de la dexametasona en los animales tratados en donde se modera la reacción inflamatoria con respecto con los animales control y reflejan el proceso patológico del sinovio, superficie articular, hueso, proliferación vascular y aumento en la población en un proceso inflamatorio crónico.

Figura. 4-3 Corte histológico animal normal. Superficie articular con tinción hematoxilina-eosina sin lesiones visibles en superficie y sinovio. **A.** Superficie articular sin lesiones visibles 40X, HyE. **B.** Superficie articular sin lesiones, tejido óseo normal 100X, HyE.

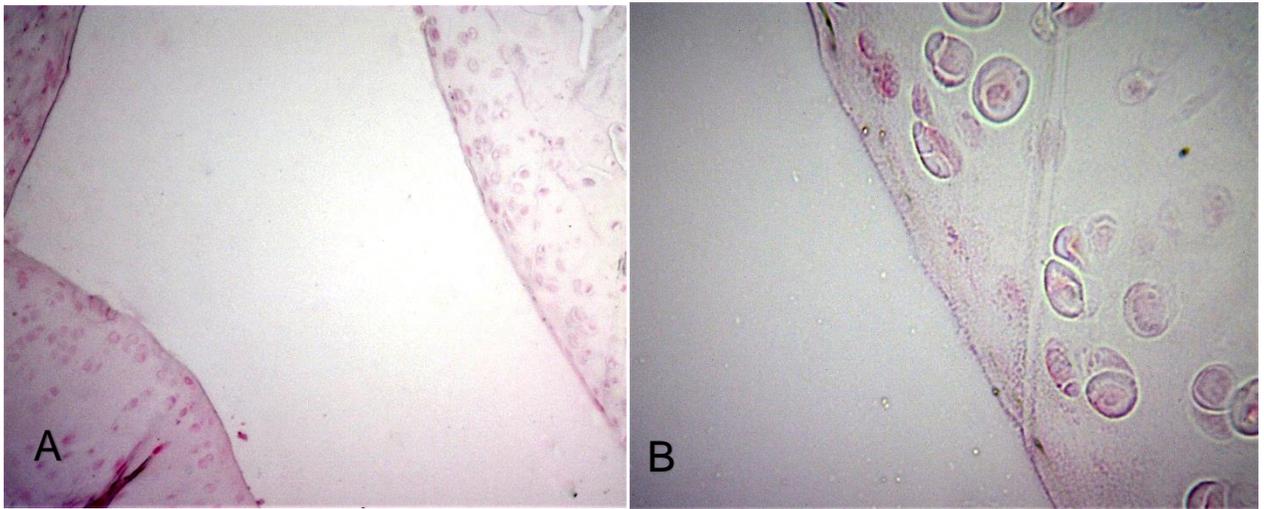


En la tabla 4-6 se resumen los principales hallazgos histológicos encontrados en un animal que se considera normal dado que no se le ha inducido el proceso artrítico. En resumen, no se evidencia infiltración ni proliferación celular, ni se evidencian lesiones como erosión o formación de pannus.

Tabla. 4-6 Hallazgos histopatológicos en animal normal.

IDENTIFICACIÓN	Proliferación sinovial	Infiltración celular	Erosión del cartílago	Formación de pannus
ANIMAL NORMAL	No se encontró. Grado 0	No se encontró. Grado 0	No se encontró erosión. Grado 0	No hubo formación de pannus. Grado 0

Figura. 4-4 Corte histológico animal no reactivo. Superficie articular con tinción hematoxilina-eosina. Ausencia de lesiones. A (40x); B(100x).



En la tabla 4-7 se muestran los principales hallazgos histológicos encontrados en un animal no reactivo (administrado con sustancia artrogénica), encontrándose que son idénticos a los de un animal normal a pesar de haber sido inyectado dos veces con el Adjuvante Completo de Freund; mostrando una resistencia natural en algunos animales de la colonia Wistar.

Tabla. 4-7 Hallazgos histopatológicos en animal no reactivo.

IDENTIFICACIÓN	Proliferación sinovial	Infiltración celular	Erosión del cartílago	Formación de pannus
ANIMAL NO REACTIVO	No se encontró. Grado 0	No se encontró. Grado 0	No se encontró. Grado 0	No hubo formación de pannus. Grado 0

Figura. 4-5 Corte histológico animal control.

A: Superficie articular con tinción hematoxilina-eosina. Severa reactividad e inflamación articular crónica activa, severa proliferación focalmente extensiva de membranas sinoviales (flecha en la parte superior derecha) y de cartílago articular (punta de flecha en el borde izquierdo). Amplificación 100x. **B:** Superficie articular con tinción hematoxilina-eosina. Severa reactividad e inflamación articular crónica activa. Superficie articular con severa proliferación focalmente extensiva de membranas sinoviales (flecha a la derecha). Severa infiltración inflamatoria mixta (punta de flecha en la izquierda). Amplificación 100x.

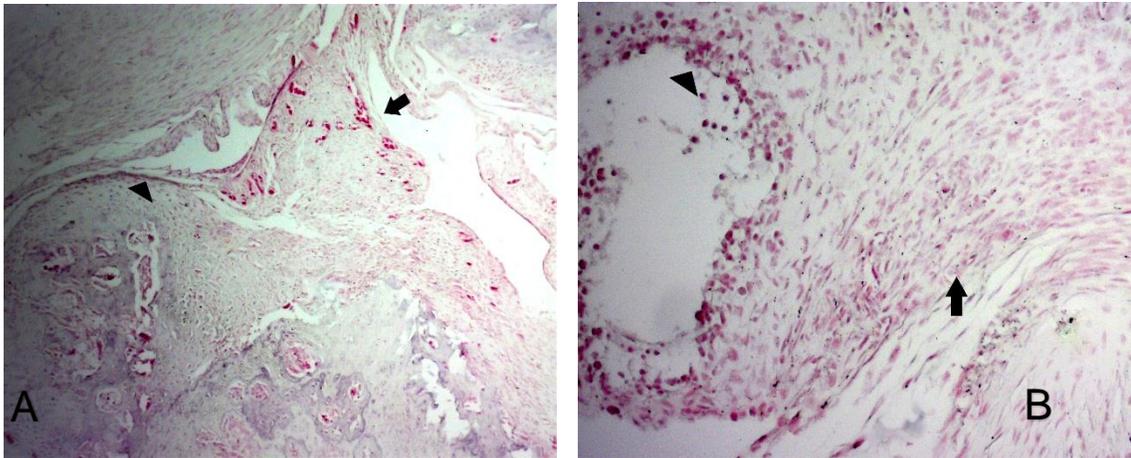


Tabla. 4-8 Hallazgos histopatológicos en animal control (artrítico sin tratamiento) .

IDENTIFICACIÓN	Proliferación sinovial	Infiltración celular	Erosión del cartílago	Formación de pannus	Comentario
ANIMAL CONTROL	Proliferación severa de la membrana sinovial con múltiples capas de sinoviocitos activos e infiltración en el cartílago y en el hueso subcondral. Grado 3	Severa infiltración inflamatoria multifocal mixta con abundantes neutrófilos, linfocitos y plasmáticas. Grado 3	Severa erosión del cartílago. Grado 3	Severa formación de pannus. Grado 3	Severa reactividad e inflamación articular crónica activa.

Figura. 4-6 Corte histológico animal artrítico tratado con dexametasona **A**. Superficie articular con proliferación de sinoviocitos (flecha). Tinción H y E, amplificación 100X. **B** Superficie articular con severa proliferación focalmente extensiva de membranas sinoviales (flecha en la parte inferior izquierda). Cartílago articular (punta de flecha a la izquierda). Tinción H y E, amplificación 100X.

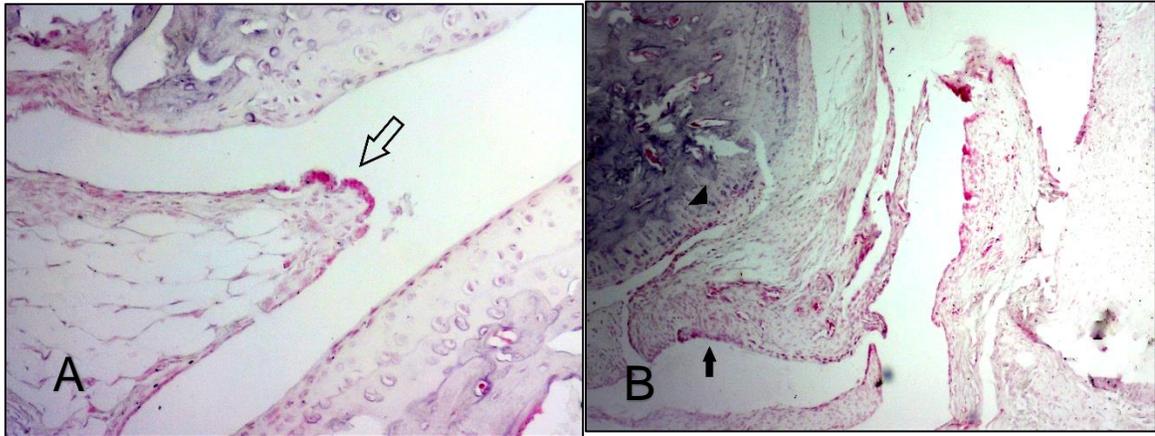


Tabla. 4-9 Hallazgos histopatológicos en animal artrítico tratado con dexametasona.

IDENTIFICACIÓN	Proliferación sinovial	Infiltración celular	Erosión del cartílago	Formación de pannus	Comentario
ANIMAL TRATADO	Proliferación severa de la membrana sinovial con múltiples capas de sinoviocitos activos e infiltración en el cartílago y en el hueso subcondral. Grado 3	No se encontró infiltración. Grado 0	Moderada infiltración del cartílago multifocal. Grado 3	No hubo formación de pannus. Grado 0	Severa reactividad articular de sinoviocitos con erosión cartilaginosa además de evidencia de diferentes grados de mineralización.

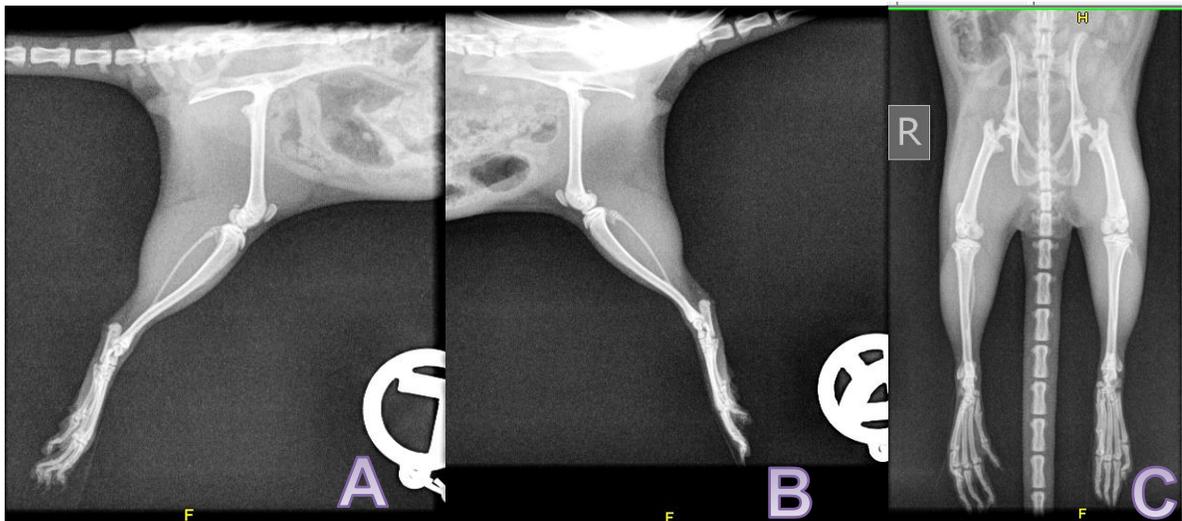
4.2.1 Estudio radiográfico.

El reporte radiológico completo se adjunta en el anexo E. Se observó que no hay lesiones degenerativas previas en animales blanco (sin tratamiento), los animales tratados (artríticos tratados con dexametasona) se observan lesiones severas a moderadas en tarso izquierdo y leves en tarso izquierdo. En extremidad derecha solamente la vista ventrolateral permite visualizar lesiones a nivel de rodilla derecha pero ninguna lesión en tarso derecho. Los animales controles (animales artríticos sin tratamiento antiinflamatorio) manifiestan lesiones severas a nivel de tarso, región intertarsiana proximal, media y distal. Teniendo en cuenta la siguiente escala radiológica (Snehalatha *et al.*, 2013):

- Erosión de superficie ósea: Sin erosión (0), grado medio (1), grado moderado (2) y grado severo (3).
- Estrechamiento del espacio articular: Ninguno (0), mínimo (1), moderado (2) y severo estrechamiento (3).
- Destrucción espacio articular: Ninguno (0), mínimo (1), extensivo (2) y anquilosis (3).

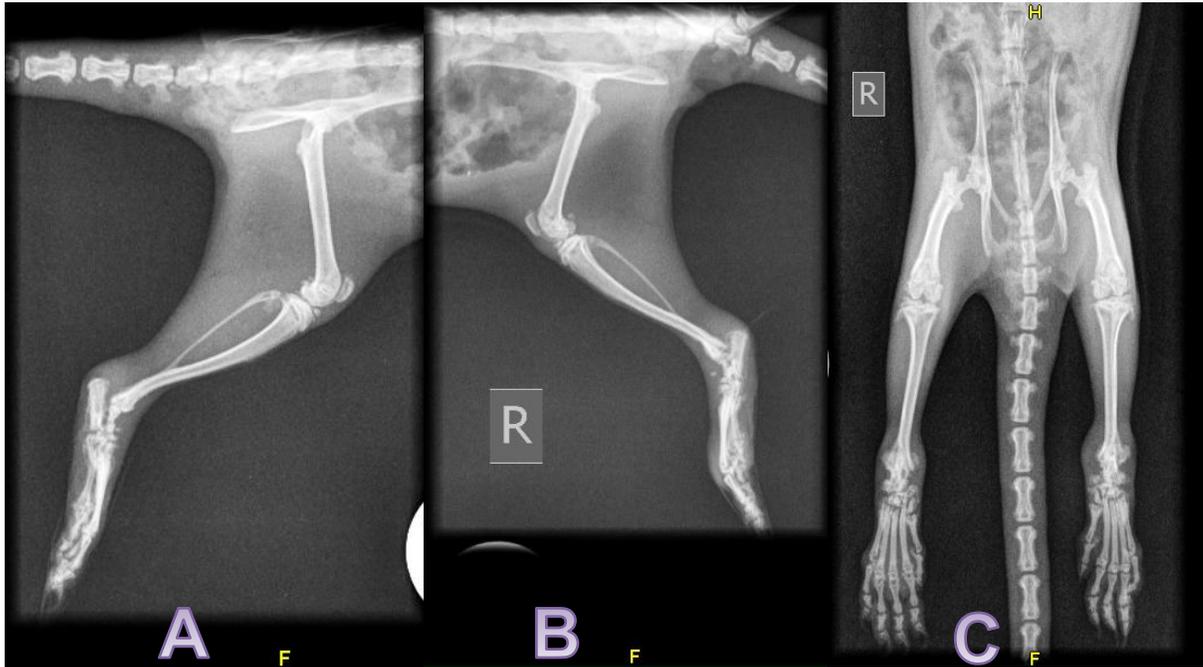
Los resultados radiológicos para los animales control revelan lesión degenerativa en superficie articular grado 3, estrechamiento articular grado 3 y destrucción del espacio articular grado 3. En contraste, los animales tratados con dexametasona presentan lesiones moderadas (2) a nivel de estrechamiento y destrucción articular y grado medio (1) de erosión ósea; por lo que se puede inferir que el cuadro artrítico está disminuyendo en respuesta a este tratamiento. Lo anterior, se explica porque hay disminución de la población celular y de la actividad de células productoras de citoquinas proinflamatorias así como disminución de la activación de los fibroblastos (sinoviocitos) y supresión de la angiogénesis. En nuestro experimento, diez días de tratamiento con dexametasona no fueron suficientes para ver osteoporosis, efecto adverso de este fármaco en tratamientos a largo plazo (Liu *et al.*, 2015).

Figura. 4-7 Placas radiográficas animal normal (no artrítico).



A. Vista mediolateral de miembro posterior izquierdo: Miembro posterior izquierdo sin evidencia de lesiones osteoarticulares. **Descripción radiográfica:** Articulación de la cadera derecha de aspecto normal; Fémur de aspecto y densidad ósea normales; articulación de la rodilla de aspecto y relaciones osteoarticulares normales; tibia y peroné de aspecto y densidad normales; articulaciones tibiotarsiana, tarsianas proximal, media y distal, tarsometatarsianas de aspecto normal; estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto normal. **B. Vista medio lateral de miembro posterior derecho:** Articulaciones tibiotarsiana, tarsianas proximal, media y distal, tarsometatarsianas de aspecto normal. **Descripción radiográfica:** Articulación de la cadera de aspecto normal; fémur de apariencia y densidad ósea normales; articulación de la rodilla de aspecto normal; tibia y peroné de apariencia y densidad ósea normales; articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsiana de aspecto normal; estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto y densidad ósea normales. **C. Vista ventrodorsal de pelvis y miembros posteriores :** No hay evidencia de lesiones osteoarticulares en el animal. **Descripción radiográfica:** Pelvis simétrica de animal adulto. Sin evidencia de alteraciones; buena densidad ósea; articulaciones de cadera de aspecto normal; fémures de aspecto normal; articulaciones de rodilla de aspecto normal bilateral; tibias y peronés de aspecto normal; articulaciones tibiotarsianas, tarsianas, tarsometatarsianas de aspecto normal bilateral; estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto normal. **Diagnóstico radiográfico:** No hay evidencia de lesiones osteoarticulares en el animal.

Figura. 4-8 Placas radiográficas animal control (artrítico sin tratamiento antiinflamatorio).



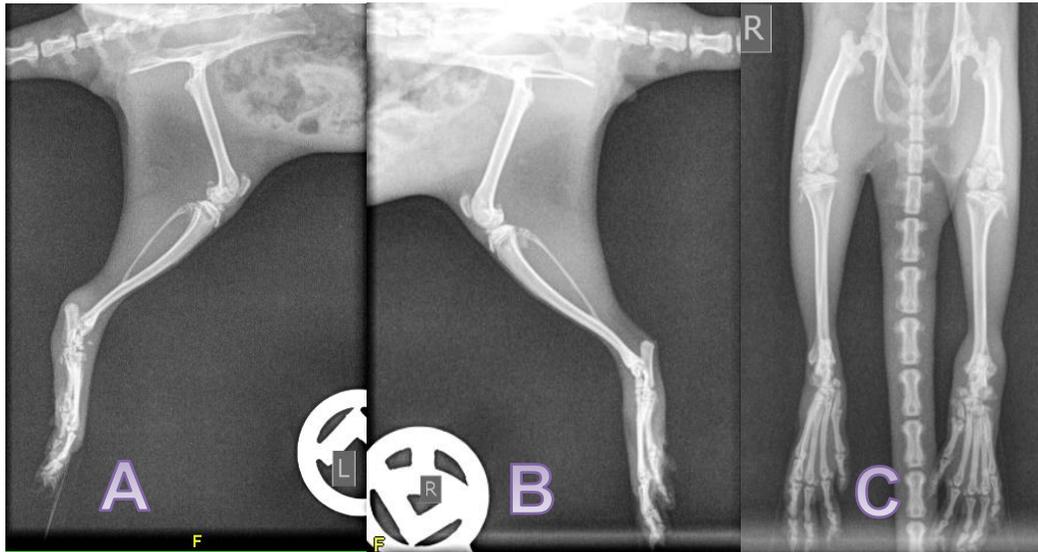
A: Vista medio lateral izquierda : Enfermedad articular severa de las articulaciones intertarsianas proximal, media y distal, lo mismo que de las articulaciones tarso metatarsianas del miembro posterior izquierdo. **Descripción radiográfica:** Articulación de la cadera sin evidencia de lesiones; fémur de aspecto y densidad ósea normales; articulación de rodilla derecha con cambios osteolíticos leves en la porción epifisiaria; pérdida leve de cartílago articular en la superficie femoral y presencia de osteofito en la cavidad articular; tibia y peroné de aspecto y densidad ósea normales; cambios severos de pérdida de densidad ósea y esclerosis, en las estructuras óseas de las articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsiana; presencia de osteofitos en las superficies anterior y posterior de la articulación y gran inflamación de tejidos blandos periarticulares; proliferación de periostio; huesos metatarsianos con aumento de densidad en las regiones metafisiarias y epifisiarias, destrucción de cartílago articular de articulación metatarso falángica y evidencia de gran inflamación de tejidos blandos periarticulares; proliferación de periostio. **B: Vista medio lateral derecha:** Enfermedad articular severa de las articulaciones tibiotarsiana, intertarsiana proximal, media, distal y de la articulación tarso metatarsiana derecha. Presencia de osteofitos en la superficie anterior de la articulación y proliferación severa de periostio en toda el área afectada. **Descripción radiográfica:** Paciente joven con presencia de líneas de crecimiento a punto de cerrar; fémur de apariencia normal; rótula de apariencia normal; articulación de la rodilla de apariencia normal; relaciones osteoarticulares conservadas; tibia de aspecto normal; presencia de enfermedad articular degenerativa severa que involucra las articulaciones intertarsianas proximal, media, distal y la articulación tarso metatarsiana; se observan áreas de osteólisis severa, acompañadas de áreas de proliferación perióstica con esclerosis ósea y proliferación de tejido fibroso articular; el proceso inflamatorio y de remodelación involucra también la metafisis proximal de los

metatarsianos y la metáfisis distal de uno de los metatarsianos; reacción perióstica severa en estructuras óseas del tarso y metatarso e inflamación severa de tejidos blandos periarticulares. **C: Vista ventrodorsal de pelvis y miembros posteriores:** Artritis leve de rodilla derecha, Artritis leve de rodilla izquierda, Artritis severa bilateral de tarsos.

Descripción radiográfica: Pelvis simétrica con aspecto y densidad ósea normales; articulaciones de la cadera sin evidencia de alteraciones; fémures de aspecto y densidad ósea normales; articulación de la rodilla derecha, con evidencia de leves cambios osteoartroticos, consistentes con pérdida de la densidad ósea normal y leves defectos en la superficie articular; articulación de la rodilla izquierda con pérdida de la densidad ósea en la epífisis distal de fémur, erosión del cartílago articular e inflamación de tejido blando periarticular; artritis severa de las dos articulaciones del tarso. En los dos lados hay remodelación ósea con osteolisis y esclerosis de componentes de hueso; superficies articulares con pérdida de cartílago y pérdida de la relación osteoarticular normal; presencia de osteofitos periarticulares; inflamación severa de los tejidos blandos periarticulares; estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto y densidad ósea normales.

Diagnostico radiográfico: Artritis leve de rodilla derecha. Artritis leve de rodilla izquierda. Artritis severa bilateral de tarsos.

Figura. 4-9 Placas radiográficas animal tratado con dexametasona.



A: Vista mediolateral de miembro posterior izquierdo: Artritis severa de articulaciones del tarso izquierdo. **Descripción radiográfica:** Articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsianas, con evidencia de destrucción de cartílago articular, osteolisis y esclerosis de los componentes óseos, presencia de osteofitos en superficies anterior y posterior de la articulación y presencia de inflamación moderada de tejidos blandos periarticulares.

B: Vista medio lateral de miembro posterior derecho: No hay evidencia de lesiones en miembro posterior derecho.

C: Vista ventrodorsal de pelvis y miembros posteriores: Artritis moderada en rodilla derecha, artritis leve de rodilla izquierda, artritis severa de articulaciones del tarso izquierdo. **Descripción radiográfica:** Pelvis de aspecto y densidad ósea normales; articulaciones de la cadera de aspecto y relaciones osteoarticulares normales, bilateral; fémures de aspecto y densidad ósea normales. Bilateral; rodilla derecha con evidencia de enfermedad articular degenerativa moderada, con presencia de osteofitos en la superficie lateral y remodelación de cartílago en las superficies articulares; inflamación moderada de tejidos blandos periarticulares; rodilla izquierda con cambios radiográficos sugestivos de inflamación leve, con áreas de osteolisis y esclerosis y leve alteración de las superficies articulares y mínima inflamación de tejidos blandos; tibia derecha e izquierda de aspecto y densidad ósea normales; articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media y distal y articulación tarsometatarsiana del lado derecho de aspecto normal; huesos metatarsianos y dedos del lado derecho e izquierdo de aspecto normal; articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas y tarsometatarsianas del lado izquierdo con cambios severos de reabsorción ósea, esclerosis, pérdida de superficies articulares e inflamación severa periarticular de tejidos blandos.

Diagnóstico radiográfico: Artritis moderada en rodilla derecha. Artritis leve de rodilla izquierda. Artritis severa de articulaciones del tarso izquierdo

Conclusiones y Recomendaciones.

Se implementó el modelo de artritis en ratas hembras Wistar, con edades entre 10 y 13 semanas, administrando CFA:Colágeno tipo II (1:1) en un volumen de 0,3 mL por vía intradérmica (base de la cola) con inoculaciones en el día 1 y repetición al día 7. La selección de los animales artríticos se realiza al día 21.

La determinación de parámetros físicos (medidas externas), bioquímicos (cuantificación de proteínas, interleucinas, peroxidación lipídica), así como las evaluaciones radiológicas e histopatológicas, se constituyen en herramientas útiles para el seguimiento del cuadro inflamatorio y para evaluar la acción de sustancias antiinflamatorias.

La dexametasona como sustancia patrón antiinflamatoria es útil para comparar la eficacia de ingredientes activos antiinflamatorios, ya que permite observar cambios en los parámetros propuestos y evaluados en este trabajo.

Recomendaciones

Con el fin de consolidar el modelo de artritis, se debe indagar la respuesta de la mezcla artrogénica (Adyuvante Completo de Freund : Colágeno tipo II) en ratas Wistar macho.

Con el fin de evaluar nuevas moléculas, se considera necesario ajustar los tiempos de muestreo para análisis de biomarcadores, acorde con la etapa de la inflamación que se quiera evaluar (etapa temprana, para evaluar la acción de la sustancia antiinflamatoria como profiláctico).

Se sugiere aumentar la frecuencia de muestreos para facilitar el seguimiento del curso temporal de la inflamación y el efecto del tratamiento sin tener que llegar al punto final del experimento para la toma de muestras.

Incluir dentro de los parámetros a analizar la determinación de marcadores inflamatorios como NO.

Se considera incluir otras matrices biológicas del proceso artrítico como por ejemplo sinovio, y de allí ampliar el panel de interleucinas relacionadas con su proliferación en el desarrollo de la artritis y su recuperación con tratamientos antiartríti.

A. ANEXO: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (ÁCIDO BICINCONÍNICO).

Esta prueba se fundamenta en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas, también es llamada reacción de Biuret. El ácido bicinconínico (BCA), es un reactivo cromogénico que reacciona en forma específica con el Cu^{1+} , es así, que dos moléculas de BCA reaccionan con una molécula de Cu^{1+} . La cantidad de cobre reducido se encuentra en función de la cantidad de proteína presente en la muestra, y para cuantificar esta cantidad se utiliza el espectrofotómetro, ya que la reacción se visualiza cuando la solución vira de un color azul a púrpura (absorbancia 562 nm), encontrando que la absorbancia es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución, para ello se requiere tener una solución estándar de proteína, generalmente la Albúmina Sérica Bovina.

REACTIVOS

- Albúmina sérica bovina (BSA) Micro líquido, 1 mg/mL.
- Solución de ácido bicinconínico (BCA).
- Sulfato de cobre en solución 4% p/v.
- Solución salina fisiológica (SSF)

EQUIPOS DE LABORATORIO

- Pipeta monocal de capacidad 200 μl -1000 μL .
- Pipeta monocal 5 μL -50 μL .
- Puntas para pipetas de 20 μL -200 μL ; 5 μL -50 μL .
- Erlenmeyer con 25, 50, 100 mL.
- Probeta de 25 y 50 mL.
- Homogenizador Polytron PT2100 Kinematica
- Equipo de disección
- Microplacas fondo plano de 96 pozos.
- Lector de placas con filtro para leer absorbancia a 562 nm.

ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata de laboratorio.
- Guantes desechables.

TOMA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO Y OBTENCIÓN DE LOS HOMOGENADOS.

Al día 35 del experimento todos los animales se deben sacrificar por dislocación cervical y poder proceder con la toma de muestras y disecar a nivel de la articulación tibio – metatarsal, la cual se puede observar en la siguiente imagen. Cabe aclarar que para la decisión de punto final se tuvieron en cuenta parámetros como: incapacidad para beber o alcanzar el alimento, y pérdidas de peso de hasta 30%.



- Pesar la muestra extraída, cortar con tijera en fragmentos pequeños y adicionar solución salina fisiológica (SSF), en proporción 4 mL por cada g de tejido (1:4), homogenizar en POLYTRON PT2100 (Tres ciclos de 10 segundos c/u). Finalmente, centrifugar a 3500 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Recuperar los sobrenadantes y guardar en viales tipo eppendorf, rotular adecuadamente y almacenar a -80°C hasta el momento de su uso.

Preparación de las muestras:

- Descongelar los homogenados, agitar en vortex.
- Alistar viales cónicos de 1,5 mL, en cantidad suficiente para las muestras a analizar.
- Realizar dilución 1:1 de las muestras con solución PBS pH 7.4, 100 µL de la muestras + 100 µL de PBS.
- Agitar en vortex.

Preparación del reactivo para cuantificar proteínas. El reactivo consiste de dos soluciones: la solución de trabajo A es ácido bicinconínico (BCA) y la solución B es sulfato de cobre al 4% p/v ; las cuales se mezclan en proporciones 50 partes de solución A y 1

parte de solución B. Tener en cuenta que para cada muestra se requieren 200 μL de solución A+B.

Preparación de la curva de calibración (Albúmina Sérica Bovina, 1mg/mL). Preparar las sustancias estándar, para obtener lo siguiente:

Concentración de estándares para la preparar curva de calibración.

Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)	BSA estándar 1mg/mL (μl)	PBS (μl)	Reactivo A + B (μl)	Volumen final (μl)
1000	25	0	200	225
800	20	5	200	225
600	15	10	200	225
400	10	15	200	225
200	5	20	200	225
0	0	25	200	225

Plantilla de registro placa multipozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA 1000 mg/mL	BSA 1000 mg/mL	BSA 1000 mg/mL	M3	M3	M3						
B	BSA 800 mg/mL	BSA 800 mg/mL	BSA 800 mg/mL	M4	M4	M4						
C	BSA 600 mg/mL	BSA 600 mg/mL	BSA 600 mg/mL	M5	M5	M5						
D	BSA 400 mg/mL	BSA 400 mg/mL	BSA 400 mg/mL	M6	M6	M6						
E	BSA 200 mg/mL	BSA 200 mg/mL	BSA 200 mg/mL	M7	M7	M7						
F	BSA 0 mg/mL	BSA 0 mg/mL	BSA 0 mg/mL									
G	M1	M1	M1									
H	M2	M2	M2									

Fecha de la prueba:

Nombre del ensayo:

Observaciones: Identificación de las muestras en la placa (pocillos control, pocillos de muestras M1, M2, etc).

Montaje de la microplaca:

- Adicionar 25 μ L de cada muestra acorde a la plantilla de registro. Cada muestra debe utilizar puntas individuales.
- Adicionar 200 μ L de la solución A + B en todos los pozos; para un volumen final de 225 μ L. Mezclar agitando suavemente.
- Incubar durante 30 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia a 562 nm.
- Registrar e imprimir los resultados.
- Determinar la concentración de proteína de cada muestra interpolando en la curva de calibración y teniendo en cuenta los factores de dilución.

B. ANEXO: PRUEBA PARA DETECCIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS MEDIANTE EL KIT COMERCIAL MILLIPORE MAP KIT.

PRUEBA MILLIPORE MAP KIT:

- Material biológico requerido: Muestras de homogenado y suero de animales artríticos controles y tratados con dexametasona.
- Reactivos: Fluido de corrida, agua destilada estéril.
- Puntas para pipetas monocanales o multicanales con capacidad de dispensación entre 20 μ l y 1000 μ l.
- Pipetas monocanales o multicanales con capacidad de dispensación entre 20 μ l y 1000 μ l.
- Papel aluminio.
- Vortex y agitador de placas.
- Plataforma para detección de múltiples analitos LUMINEX MAGPIX
- El kit contiene: Estándar de citocinas (liofilizado), controles de calidad (1 y 2), diluyente de perlas, microplaca de 96 pozos fondo plano y color oscuro, buffer de ensayo, buffer de lavado (10X), citocinas seleccionadas (IL-1B, IL-6, IL-10 y TNF α), estreptavidina-ficoeritrina (conjugado) y frasco de mezclas. Los componentes del kit deben dejarse atemperar (20 - 25 °C) antes de iniciar el ensayo.

MILLIPORE MAP KIT:COMPONENTES



MILLIPORE MAP KIT: Microplacas oscuras para protección de interleucinas y lectura de fluorescencia.



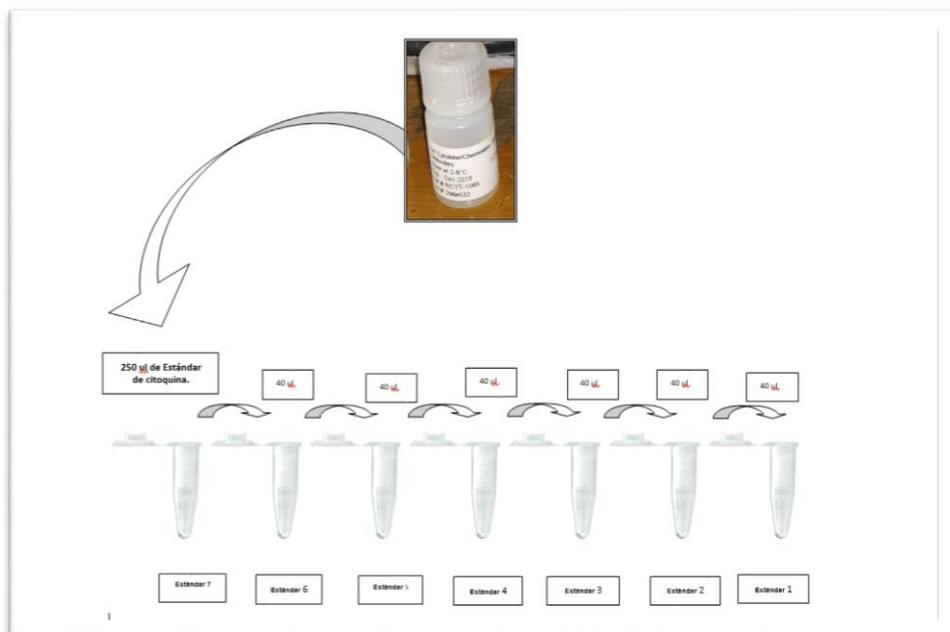
- Registre en un formato la ubicación de las muestras, en este deben incluirse los estándares (1 al 7) y controles de calidad (1 y 2). Se deben realizar el montaje en dirección vertical y por triplicado.

Preparar los siguientes reactivos:

- Perlas con antígeno inmovilizado: Agitar en vortex por al menos un minuto, adicionar 60 μ L de cada perla sensibilizada con anticuerpos (IL-1B, IL-6, IL-10 y TNF α) en el frasco de mezcla y llevar a volumen final de 3.0 mL con diluyente de perlas.
- Controles de calidad (1 y 2): Reconstituir con 25 μ L de agua destilada estéril, mezclar por inversión y agitar en vortex. Permitir que se establezca la mezcla entre 5 y 10 minutos. Esta mezcla puede almacenarse a -20 °C hasta por un mes.

- Solución de lavado: Tomar 60 mL de la solución 10X para mezclarla en 540 mL de agua destilada. Puede almacenarse entre 2 y 8 °C hasta por un mes y debe encontrarse a temperatura ambiente en el momento de la preparación.
- Matriz de suero (Cuando se utilizan como matrices sueros o plasma): Adicionar 1 mL de agua destilada estéril al suero liofilizado, mezclar por inversión y permitir la estabilización mínimo 10 minutos. Esta mezcla puede almacenarse hasta por un mes a – 20°C.
- Estándares de citocinas: Reconstituir el estándar con 250 µL de agua destilada estéril, mezclar por inversión, agitar en vortex (10 segundos), dejar estabilizar por 5 a 10 minutos. Esta preparación corresponderá al estándar siete (7) y puede almacenarse a -20 °C durante al menos un mes.
- Estándares de trabajo: Utilizar 6 tubos de microcentrifuga (1,5 mL), numerados de 1 a 6 y adicionar 120 µL de buffer de ensayo, posteriormente tomar 40 µL de estándar 7 y adicionar al vial identificado como 6, repetir este paso hasta llegar al vial número 1.

Estándares de trabajo interleucinas.



- De la anterior preparación se obtienen las siguientes concentraciones de las interleucinas a evaluar:

ESTÁNDAR	IL-1 β (pg/mL)	TNF α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
1	2,4	2,4	73,2	7,3
2	9,8	9,8	293,0	29,3
3	39,1	39,1	1.171,9	117,2
4	156,3	156,3	4.687,5	468,8
5	625,0	625,0	18.750,0	1.875,0
6	2.500,0	2.500,0	75.000,0	7.500,0
7	10.000,0	10.000,0	30.000,0	30.000,0

- Adicione 25 μ L de estándares y controles por duplicado en las celdas correspondientes.
- Agregue 25 μ L de buffer de ensayo para ruido de fondo, estándares y controles.
- Adicione 25 μ L de muestras, en las celdas correspondientes.
- Agregue 25 μ L de perlas en todas las celdas.
- Cubra la microplaca con sello y papel aluminio e Incube 2 horas a temperatura ambiente con agitación o 18 horas en refrigeración y agitación.
- Proceda al lavado de la microplaca. Utilizando el soporte magnético.
- Adicione 25 μ L de anticuerpos de detección de citocinas. Cubra la microplaca con sello y papel aluminio e Incube una hora a temperatura ambiente.
- Adicione 25 μ L de estreptavidina-ficoeritina a los 25 μ L de anticuerpos de detección de citocinas.
- Cubra la microplaca con sello y papel aluminio e Incube treinta minutos a temperatura ambiente.

- Proceda al lavado de la microplaca. Utilizando el soporte magnético.
- Agregue 125 μ L de fluido de corrida, resuspenda las perlas con agitación durante 5 minutos.
- Proceda a la lectura en el MAGPIX.
- Determinar la concentración de interleucinas a partir de la curva de calibración.

C. ANEXO: PRUEBA TBARS

Fundamento. El estrés oxidativo sobre membranas biológicas desencadena peroxidación lipídica, produciendo moléculas de pequeño tamaño como el malonilaldehído (MDA). Este se constituye en un recurso analítico por representar a las moléculas que reaccionan con el ácido Tiobarbitúrico (TBARS) produciendo aductos coloreados detectables por su absorbanca a 532 nm.

El MDA se puede originar por la hidrólisis ácida (HCl 0.1 N) del reactivo 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP). El medio de reacción que contiene las muestras biológicas (suero, exudados inflamatorios; etc.) se hace reaccionar en medio ácido (ácido Tricloroacético al 10%) con TBA al 0,67%, calentando a 90 °C durante 30 minutos. Después de enfriamiento, las muestras de sobrenadante se leen a 523nm para calcular mediante una curva de calibración la concentración de MDA.

Protocolo.

TMP, solución comercial: 5,87 Molar. A partir de ésta se preparan solución stock-A 200 miliMolar en HCl 0.1 Normal, con calentamiento a 37 °C durante una hora. Luego, solución stock-A' 2000 microMolar y, finalmente, solución de trabajo 20 miliMolar. La curva de calibración para MDA consiste de varias diluciones de concentración final entre 1 y 10 microMolar, previa reacción con TBA al 0, 67%.

Se toman en viales eppendorf 250 microlitros de muestras de homogenados de pata o de plasma sanguíneo, se adicionan 500 microlitros de TCA al 10%, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante obtenido se toman 250 microlitros y se mezclan en tubo de ensayo con 250 microlitros de TBA al 0.67%, se calientan en baño de agua a 90 °C durante 30 minutos. Se enfría en baño de hielo. Luego, se colocan en placas multipozos 150 microlitros de cada muestra, por triplicado, y se lee su absorbanca a 532 nm en lector de placas. La concentración de MDA se calcula interpolando en la curva de calibración.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en nuestro experimento, como una guía para futuras investigaciones.

Tabla C-1. Curva de calibración MDA

MDA (microMolar)	10	5	2.5	1.25	0.63
Absorbancia (532nm)	0.448	0.291	0.164	0.123	0.090

Coefficiente de correlación $r=0.995$. Pendiente, $b=0.038$. Intercepción eje Y, $a= 0.074$.

Recta: $Y = a + bX$ (donde X es la concentración y Y la absorbancia). Entonces $X = (Y-a)/b$

Tabla C-2. Concentración de MDA en muestras biológicas de animales artríticos.

	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO
	NANOMOLES MDA/mg de proteína		NANOMOLES MDA/gramo de tejido	
	19	11	9,32	3,48
	18	18	8,40	5,16
	12	12	5,16	4,04
	16	18	6,84	5,88
	24	22	11,12	7,24
	18	10	5,88	3,40
		18		5,80
n	6	7	6	7
MEDIA	18	16	7,79	5,00
D.E.	4	5	2,25	1,43
CV (%)	21	29	28,87	28,58

D. Anexo: Procedimiento para inducción de artritis en pequeños roedores de laboratorio

Animales:

- Ratas Wistar hembras de 10 a 13 semanas, con pesos en un rango de 170 a 200 g.

Reactivos:

- Adyuvante completo de Freund Sigma que contenga 1 mg/mL.
- Colágeno tipo II, en concentración de 5 mg/mL.

Materiales de aplicación y preparación de soluciones:

- Jeringas de dos partes por 3 mL.
- Jeringas de dos partes por 1 mL.
- Agujas 21G X ½.
- Agujas 20G X ½.
- Viales en vidrio por 5 mL.
- Algodón o toallas de papel.

Equipos de medición:

- Pletismómetro Ugo Basile.
- Caliper digital para medidas externas.
- Calibrador micrométrico.

Elementos de protección personal:

- Bata de laboratorio.
- Guantes desechables.
- Guantes de carnaza

Pesaje de animales. Los animales deben ser pesados e identificados.

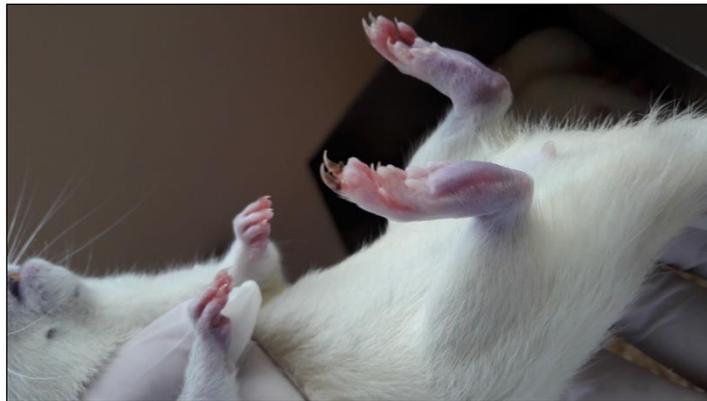
Administración del adyuvante

- Preparación de la solución artrogénica: La cantidad dependerá del número de animales a inmunizar teniendo en cuenta que el volumen a administrar es de 0,3 mL. La emulsión se compone de una parte de Colágeno tipo II (5 mg/mL) y una parte de Adyuvante Completo de Freund (1 mg/mL).
- En un frasco de mezcla adicione partes iguales de Colágeno tipo II y Adyuvante Completo de Freund.
- Mezcle y homogenice con jeringa de 3 mL y pase por aguja 20G x ½. La emulsión debe tener una sola fase visible.
- Disponga de una jeringa de 1 mL, aguja desechable nueva 20G x ½.
- Seleccione un animal en orden de numeración y proceda a inmovilizarlo.
- Administre vía intradérmica en la base de la cola 0,1 mL en cada uno de los tres sitios administrando un volumen final de 0,3 mL. Mantenga presión para evitar pérdida de la solución. Se debe realizar este paso revisando que el volumen aplicado se visualice como una elevación en la superficie de la piel que rodea el sitio de inoculación. Continuar hasta completar el número de animales del experimento.



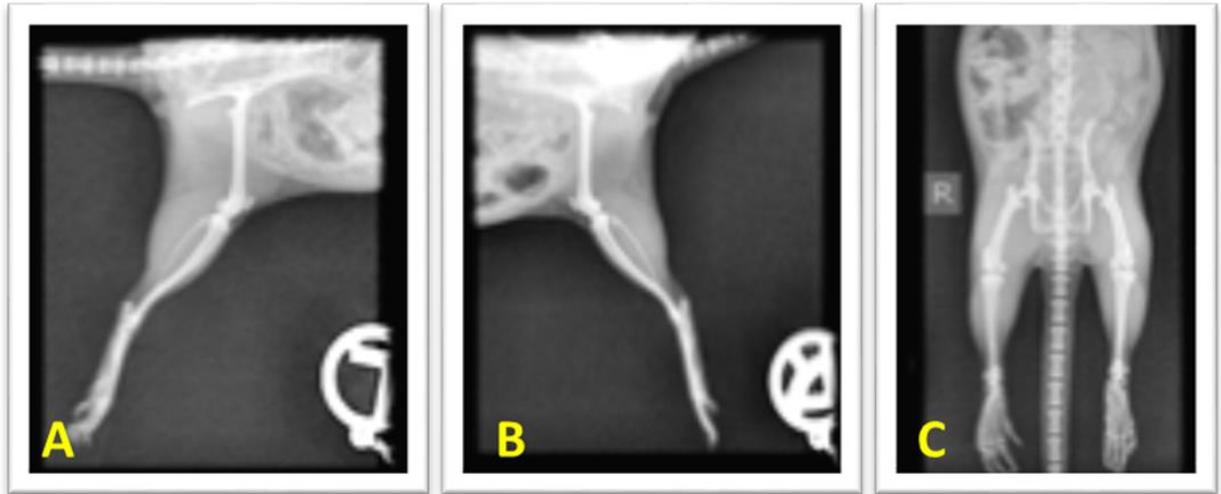
- Ubique los animales en los estantes correspondientes y cerciórese que dispongan de alimento, agua y camas limpias y que queden identificados.

- Revise los animales diariamente y registre las observaciones.
- Realice las mediciones según el diseño de la prueba.
- En los días 14, 21, 28 y 35, pesar los animales, medir el diámetro de las articulaciones y observar macroscópicamente las lesiones presentadas. Registrar en formato.
- La artritis se podrá observar (foto anexa) en los animales en forma bilateral (incluyendo las cuatro extremidades), a los 21 días con un porcentaje de reproducibilidad entre 88 y 100 % .



E. Anexo. Reportes radiográficos

ANIMAL NORMAL (Animal que no ha recibido sustancias artrogénicas y tiene condiciones de edad y peso similares a los animales cuando iniciaron el proceso artrítico).



TOMA A: Vista medio lateral de miembro posterior derecho.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Articulación de la cadera derecha de aspecto normal.

Fémur de aspecto y densidad ósea normales.

Articulación de la rodilla de aspecto y relaciones osteoarticulares normales.

Tibia y peroné de aspecto y densidad normales.

Articulaciones tibiotarsiana, tarsianas proximal, media y distal, tarsometatarsianas de aspecto normal.

Estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto normal.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

Miembro estudiado de aspecto radiográfico normal.

TOMA B: Vista mediolateral de miembro posterior izquierdo.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Articulación de la cadera de aspecto normal.

Fémur de apariencia y densidad ósea normales.

Articulación de la rodilla de aspecto normal.

Tibia y peroné de apariencia y densidad ósea normales.

Articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsiana de aspecto normal.

Estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto y densidad ósea normales.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

Miembro posterior izquierdo sin evidencia de lesiones osteoarticulares.

TOMA C: Vista ventrodorsal de pelvis y miembros posteriores.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Pelvis simétrica de animal adulto. Sin evidencia de alteraciones. Buena densidad ósea. Articulaciones de cadera de aspecto normal.

Fémures de aspecto normal.

Articulaciones de rodilla de aspecto normal bilateral.

Tibias y peronés de aspecto normal.

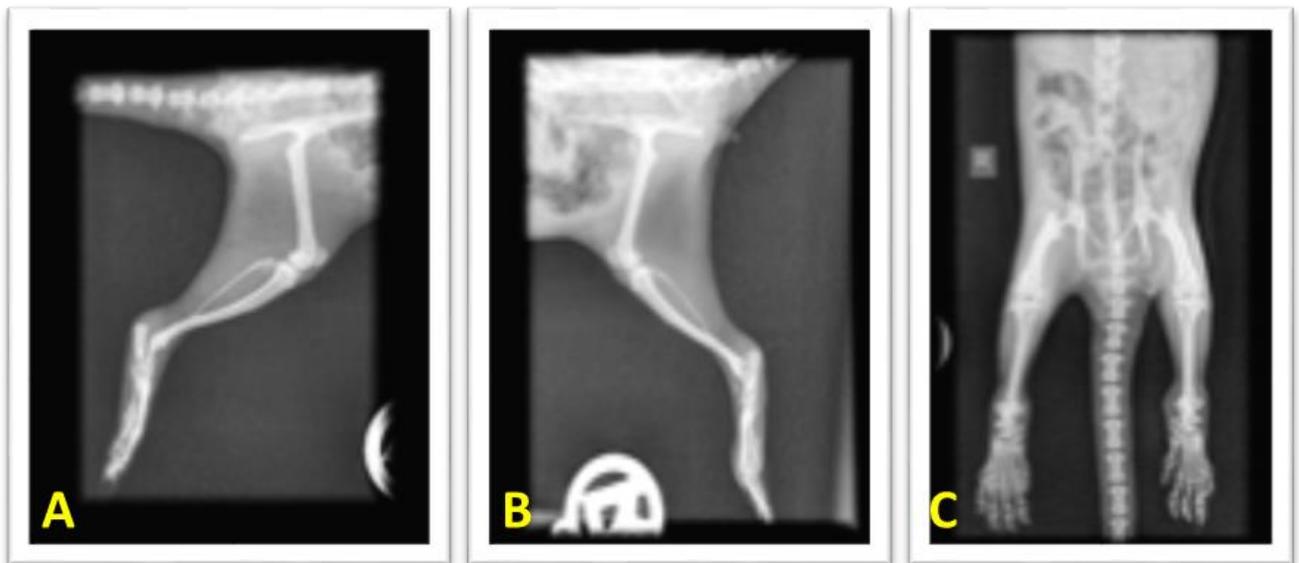
Articulaciones tibiotarsianas, tarsianas, tarsometatarsianas de aspecto normal bilateral.

Estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto normal.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

No hay evidencia de lesiones osteoarticulares en el animal.

ANIMAL CONTROL (corresponde a un animal artrítico que no recibió tratamiento antiinflamatorio).



TOMA A: Vista medio lateral de miembro posterior derecho.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Articulación de la cadera sin evidencia de lesiones.

Fémur de aspecto y densidad ósea normales.

Articulación de rodilla derecha con cambios osteolíticos leves en la porción epifisaria, pérdida leve de cartílago articular en la superficie femoral y presencia de osteofito en la cavidad articular.

Tibia y peroné de aspecto y densidad ósea normales.

Cambios severos de pérdida de densidad ósea y esclerosis, en las estructuras óseas de las articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsiana.

Presencia de osteofitos en las superficies anterior y posterior de la articulación y gran inflamación de tejidos blandos periarticulares. Proliferación de periostio.

Huesos metatarsianos con aumento de densidad en las regiones metafisiarias y epifisiarias, destrucción de cartílago articular de articulación metatarso falángica y evidencia de gran inflamación de tejidos blandos periarticulares. Proliferación de periostio.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

Artritis moderada de rodilla derecha.

Artritis severa de articulaciones del tarso derecho.

Artritis severa metatarso falángica.

Osteomielitis de huesos del metatarso.

TOMA B: Vista medio lateral de miembro posterior izquierdo.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Paciente joven con presencia de líneas de crecimiento a punto de cerrar.

Fémur de apariencia normal.

Rótula de apariencia normal.

Articulación de la rodilla de apariencia normal. Relaciones osteoarticulares conservadas.

Tibia de aspecto normal.

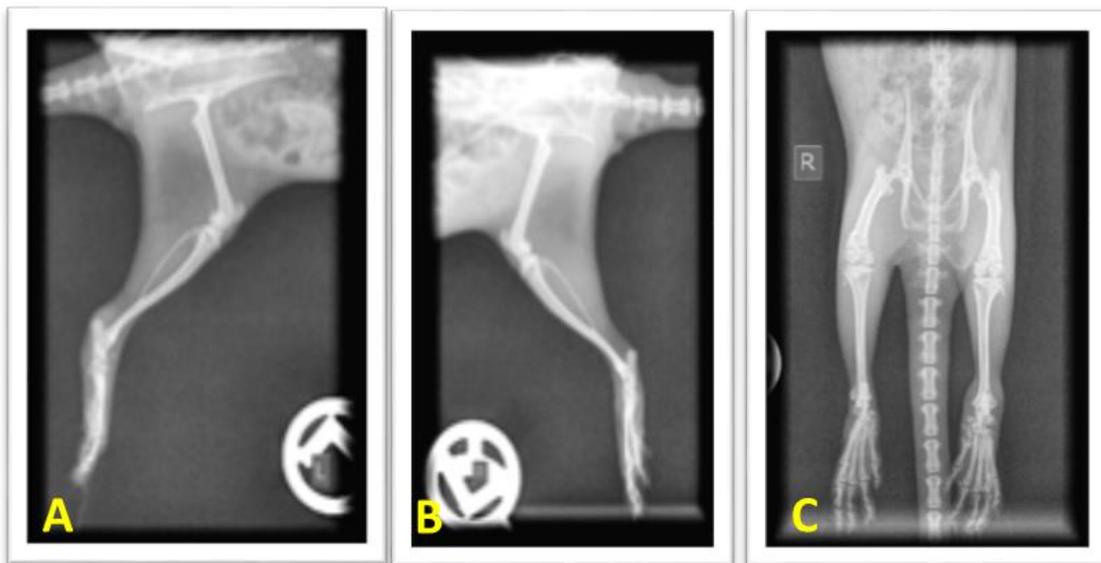
Presencia de enfermedad articular degenerativa severa que involucra las articulaciones intertarsianas proximal, media, distal y la articulación tarso metatarsiana. Se observan áreas de osteolisis severa, acompañadas de áreas de proliferación perióstica con esclerosis ósea y proliferación de tejido fibroso articular. El proceso inflamatorio y de remodelación involucra también la metafisis proximal de los metatarsianos y la metafisis distal de uno de los metatarsianos.

Reacción perióstica severa en estructuras óseas del tarso y metatarso.

Inflamación severa de tejidos blandos periarticulares.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

Enfermedad articular severa de las articulaciones intertarsianas proximal, media y distal, lo mismo que de las articulaciones tarso metatarsianas del miembro posterior izquierdo.



ANIMAL TRATADO (corresponde a un animal artrítico tratado con dexametasona).

TOMA A: vista mediolateral de miembro posterior derecho.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Animal joven con líneas de crecimiento abiertas.

Articulación de la cadera de aspecto normal.

Fémur de aspecto y densidad ósea normales.

Articulación de la rodilla de aspecto y relaciones osteoarticulares normales.

Tibia y peroné de aspecto y densidad ósea normales.

Articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsiana sin evidencia de alteraciones.

Estructuras óseas de metatarsos y dedos de aspecto y densidad ósea normales.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

No hay evidencia de lesiones en miembro posterior derecho.

TOMA B: Vista medio lateral de miembro posterior izquierdo.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA:

Articulación de la cadera sin evidencia de lesiones.

Fémur de aspecto y densidad ósea normales.

Articulación de la rodilla sin evidencia de lesiones y con relaciones osteoarticulares normales.

Tibia y peroné de aspecto y densidad ósea normales.

Articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media, distal y tarsometatarsianas, con evidencia de destrucción de cartílago articular, osteolisis y esclerosis de los componentes óseos, presencia de osteofitos en superficies anterior y posterior de la articulación y presencia de inflamación moderada de tejidos blandos periarticulares.

DIAGNOSTICO RADIOGRAFICO:

Artritis severa de articulaciones del tarso izquierdo.

TOMA C: Vista ventrodorsal de pelvis y miembros posteriores.

DESCRIPCIÓN RADIOGRÁFICA: Pelvis de aspecto y densidad ósea normales.

Articulaciones de la cadera de aspecto y relaciones osteoarticulares normales, bilateral.

Fémures de aspecto y densidad ósea normales. Bilateral.

Rodilla derecha con evidencia de enfermedad articular degenerativa moderada, con presencia de osteofitos en la superficie lateral y remodelación de cartílago en las superficies articulares. Inflamación moderada de tejidos blandos periarticulares.

Rodilla izquierda con cambios radiográficos sugestivos de inflamación leve, con áreas de osteolisis y esclerosis y leve alteración de las superficies articulares y mínima inflamación de tejidos blandos.

Tibia derecha e izquierda de aspecto y densidad ósea normales.

Articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas proximal, media y distal y articulación tarsometatarsiana del lado derecho de aspecto normal.

Huesos metatarsianos y dedos del lado derecho e izquierdo de aspecto normal.

Articulaciones tibiotarsiana, intertarsianas y tarsometatarsianas del lado izquierdo con cambios severos de reabsorción ósea, esclerosis, pérdida de superficies articulares e inflamación severa periarticular de tejidos blandos.

DIAGNÓSTICO RADIOGRÁFICO:

Artritis moderada en rodilla derecha.

Artritis leve de rodilla izquierda.

Artritis severa de articulaciones del tarso izquierdo

F. Anexo. Aval ético

**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA**
SEDE BOGOTÁ

**COMITÉ DE ETICA FACULTAD DE
CIENCIAS**

Bogotá, Febrero 09 de 2015

Estudiante
Aida Ivette Rojas Sabogal
Departamento de Farmacia

Respetada Estudiante:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 09 de Febrero de 2015 (Acta 01-2015), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: Implementación de un modelo de artritis en pequeños roedores de laboratorio para el estudio de sustancias con actividad antiinflamatoria.

Responsables: **Aida Ivette Rojas Sabogal** (Estudiante Maestría en Ciencias-Farmacología), **Luis Fernando Ospina Giraldo** (Director de Tesis, Profesor del Departamento de Farmacia).

Observaciones:
Se emplearán ratas Wistar, hembras y/o machos adultos jóvenes, para la inducción de artritis mediante Adyuvante Completo de Freund (ACF). Para esta investigación se acogerán directrices nacionales contenidas en la Resolución 008430 de 1993 (MinSalud), en cuanto al cuidado y uso de animales de experimentación. Se establece el compromiso para el entrenamiento del personal participante en cuanto al reconocimiento y manejo del riesgo biológico, aplicando los protocolos institucionales de gestión ambiental.

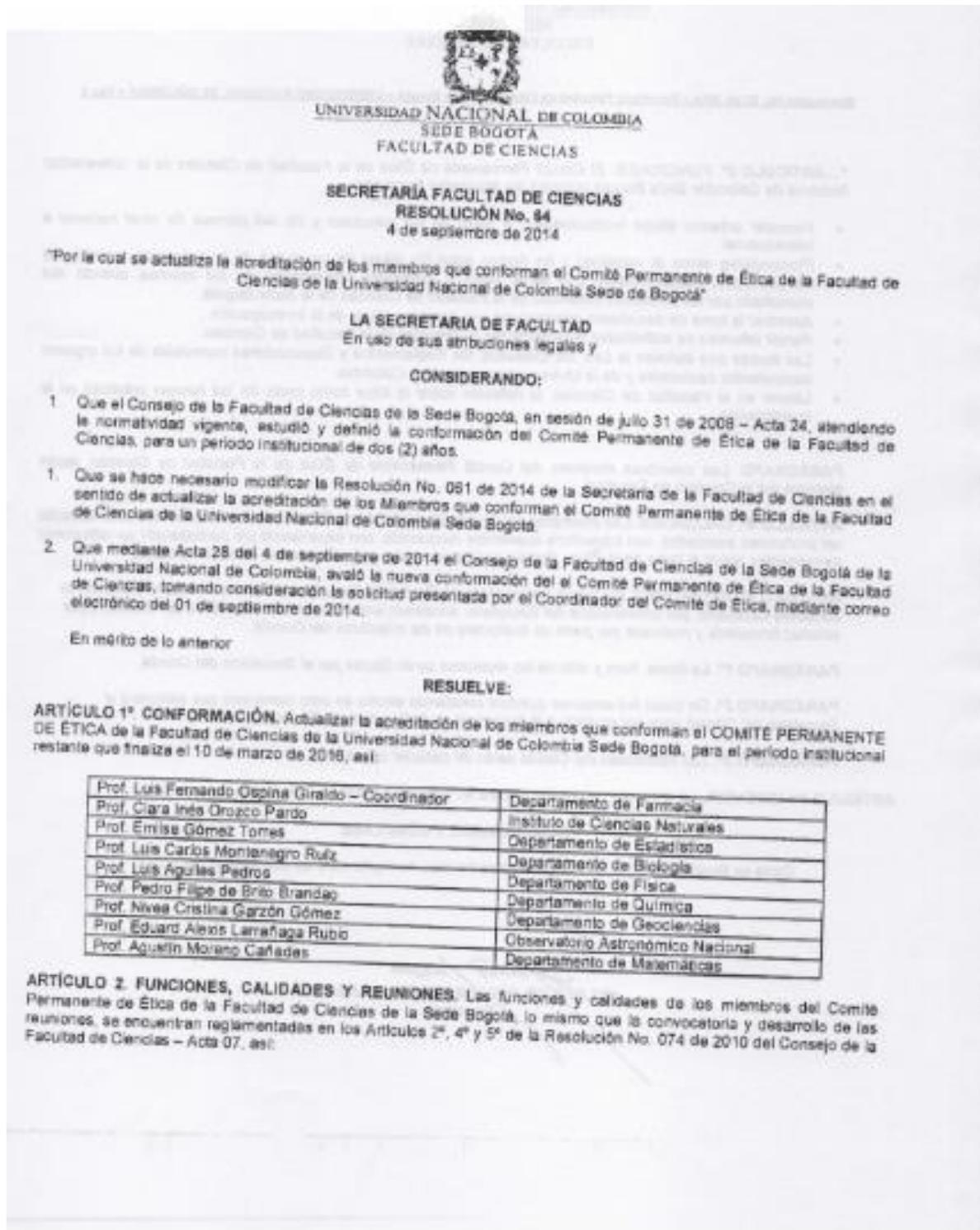
Concepto: Aprobado,



LUIS FERNANDO OSPINA GIRALDO
Coordinador Comité de Ética

5

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE CIENCIAS, Edificio 450, 4º piso, Oficina 400
Teléfono: (57-1) 318 5045 Computador: (57-1) 318 5000 Ext. 14666 Fax: 14456
Correo electrónico: Etica@unal.edu.co / Bogotá, Colombia, Sur América




UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS

Resolución No. 84 de 2014 – Secretaría Facultad de Ciencias – Sede Bogotá – UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – Pág. 2

RESOLUCIÓN

"...ARTÍCULO 2º. FUNCIONES. El Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá cumplirá las siguientes funciones:

- Formular criterios éticos institucionales, a partir de los principios y de las normas de nivel nacional e internacional.
- Pronunciarse sobre la viabilidad y los demás aspectos éticos de proyectos de investigación sometidos a consideración, especialmente con seres vivos o materiales procedentes de los mismos, cuando sea consultado por las diferentes instancias de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá.
- Asesorar la toma de decisiones relacionadas con aspectos éticos de la investigación.
- Rendir informes de actividades solicitados por la Dirección de la Facultad de Ciencias.
- Las demás que señalen la Ley, los Estatutos, los Reglamentos y Disposiciones especiales de los órganos competentes nacionales y de la Universidad Nacional de Colombia.
- Liderar en la Facultad de Ciencias, la reflexión sobre la ética como parte de las buenas prácticas en la investigación.

PARÁGRAFO. Los miembros docentes del Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias, serán elegidos por el Consejo de Facultad.

ARTÍCULO 4º. CALIDADES. Los miembros del Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias, deberán ser profesores asociados, con trayectoria académica reconocida, con experiencia y/o participación en reflexiones permanentes sobre el tema de la Ética. Podrán participar profesores pensionados de la Universidad.

ARTÍCULO 5º. REUNIONES. El Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias se reunirá cuando se considere necesario, por convocatoria del Secretario, nombrado entre los mismos miembros del Comité, o por solicitud formulada y motivada por parte de cualquiera de los miembros del Comité.

PARÁGRAFO 1º. La fecha, hora y sitio de las reuniones serán fijadas por el Secretario del Comité.

PARÁGRAFO 2º. De todas las sesiones quedará constancia escrita en acta numerada que elaborará el Secretario del Comité para ser enviada a la Secretaría de la Facultad de Ciencias.

PARÁGRAFO 3º. Las decisiones del Comité serán de carácter consensual..."

ARTÍCULO 3º: VIGENCIA. La presente resolución entrará en vigencia a partir de la fecha de su expedición

COMUNIQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá, D. C., a los doce (12) días del mes de septiembre de dos mil catorce (2014)


HELBER DE JESÚS BARBOSA BARBOSA
 Secretario

Bibliografía.

- Abdel El-Gaphar O., Abo-Youssef AM, & Abo-Saif, AA (2018). Effect of losartan in complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 17(4):1420-1430.
- Alam MN, Bristi NJ, & Rafiquzzaman M (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21(2):143-152.
- Antonis I, Lakshmi K & George CT (2013). Platelets, complement and tissue inflammation. *Autoimmunit* (46):1, 1-5, DOI: [10.3109/08916934.2012.722144](https://doi.org/10.3109/08916934.2012.722144)
- Aali EA, Barakat BM, & Hassan R (2015). Antioxidant and angiostatic effect of *Spirulina platensis* suspension in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *PLoS one* 10(4): e0121523. doi:10.1371/journal.pone.0121523
- Astry B, Venkatesha, SH, & Moudgil, KD (2013). Temporal cytokine expression and the target organ attributes unravel novel aspects of autoimmune arthritis. *The Indian Journal of Medical Research* 138(5): 717-731.
- Baschant U, Lane NE, Tuckermann J (2012). The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 8(11):645–655.
- Bendele AM. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1:377–385
- Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP (2010). Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 62:2192–2205. 10.1002/art.27503
- Billiau A, Matthys P (2011). Collagen-induced arthritis and related animal models: How much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22:339–344. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.11.003.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V & Banchereau J (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19(1): 41-52.
- Bolzani V, Valli M, Pivato M and Viegas C (2012). Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure Appl Chem* (84): 1837-1846.
- Burmester G, Feist E, Dörner T (2014). Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10(2):77–88.
- Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Ding W, Wang F (2013). Tissue factor expression in rheumatoid

- synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. *Acta Histochem* 115:692–697.
- Chu SJ, Chen JH, Lai JH, Sytwu HK, Chan DM (2007) Interleukin (IL)-23 P19 expression induced by IL-1 in human fibroblast-like synoviocytes with rheumatoid arthritis via active nuclear Factor- B and AP-1 dependent pathway. *Rheumatology* 46:1266–1273. doi:10.1093/rheumatology/kem055.
- Cuzzocrea S (2011). Characterization of a novel and spontaneous mouse model of inflammatory arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 13(5): 126.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Muia C, Caputi AP (2005). Effects of combination M40403 and dexamethasone therapy on joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 52:1929–1940.
- Derksen V, Huizinga T & van der Woude D (2017). The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Seminars in immunopathology* 39(4):437-446.
- Di Paola R, Cuzzocrea S (2008). Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis. *Autoimmun Rev* 8:73–75.
- Díaz-Rojas JA, Dávila-Ramírez FA, Quintana-López G, Aristizábal-Gutiérrez F, y Brown P (2016). Prevalencia de artritis reumatoide en Colombia: una aproximación basada en la carga de la enfermedad durante el año 2005. *Revista Colombiana de Reumatología* 23 (1) 11–16. doi:10.1016/j.rcreu.2015.12.004.
- Dinarello CA, Simon A, & van der Meer JW (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews* 11(8): 633-652.
- Dominguez MC, Lorenzo N, Barbera A (2011). An altered peptide ligand corresponding to a novel epitope from heat-shock protein 60 induces regulatory T cells and suppresses pathogenic response in an animal model of adjuvant-induced arthritis. *Autoimmunity* 44(6):471–82, doi:10.3109/08916934.2010.550590.
- Ezeani N, Ibiam U, Orji O, Igwenyi I, Alope C, Alum E, Aja P (2019). Effects of aqueous and ethanol root extracts of *Olax subscopioidea* on inflammatory parameters in complete Freund's sduvant-collagen type II induced irthritic in albino rats. *Pharmacognosy Journal* 11(1):16-25.
- Fayaz AS, Sultan P, Ashour AE, Khan TH, Attia SM, Bakheet SA, Abd-Allah AR (2013). Modulation of Th1 cytokines and inflammatory mediators by *Euphorbia hirta* in animal model of adjuvant-induce arthritis. *Inflammopharmacology* 21(5):365–375.
- Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tulusso B, & De Benedetti F

- (2010). Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Molecular Medicine* 16(11-12): 552-557.
- Fickert P, Pollheimer MJ, Beuers U, Lackner C, Hirschfield, G Housset C, Keitel V, Schramm C, Marschall HU, Karlsen TH, Melum E, Kaser A, Eksteen B, Strazzabosco M, Manns M, Trauner M. International PSC Study Group (IPSCSG) (2014). Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). *Journal of Hepatology* 60(6): 1290-1303.
- Garcia AE, Rico MC, Liverani E, DeLa Cadena RA, Bray PF & Kunapuli SP (2013). Erosive arthritis and hepatic granuloma formation induced by peptidoglycan polysaccharide in rats is aggravated by prasugrel treatment. *PloS one* 8 (7), e69093. doi:10.1371/journal.pone.0069093.
- González MC, Ospina LF, Calle J & Rincon J (2007). Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda , subcrónica y crónica de extractos de plantas colombianas. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* 36 (2): 166-174.
- Gu J, Gui Y, Chen L, Yuan G, Lu HZ, & Xu X (2013). Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. *PloS One* 8(4):e62839. doi:10.1371/journal.pone.0062839
- Hall SW, Cooke A. (2011). Autoimmunity and inflammation: murine models and translational studies. *Mammalian Genome* 22(7–8):377–389. 10.1007/s00335-011-9338-2
- Imran M (2012). Studies on the role of alpha enolase as a candidate autoantigen in pristane - induced arthritis and immunological tolerance of citrullinated type II collagen. Master Thesis, Swedish University of Agricultural Science.
- Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M & Williams RO (2007). Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis Research & Therapy* 9(5): R113.
- Ioannou, Antonis, Kannan L, Tsokos G. (2013). Platelets, Complement and Tissue Inflammation. *Autoimmunity* 46(1), Feb: 1–5, doi:10.3109/08916934.2012.722144.
- Iwalewa, EO, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff JN (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *Afr J Biotechnol* 6: 2868-2885.
- Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D (2005). Animal models of rheumatoid arthritis and their

- relevance to human disease. *Pathophysiology* (12):167–181. 10.1016/j.pathophys.2005.07.011.
- Kaufmann J, Feist E, Roske AE, Schmidt WA (2013). Monotherapy with tocilizumab or TNF-alpha inhibitors in patients with rheumatoid arthritis: efficacy, treatment satisfaction, and persistence in routine clinical practice. *Clin Rheumatol* (32):1347–1355.
- Kimpel D, Dayton T, Fuseler J, Gray L, Kannan K, Wolf RE (2003). Splenectomy attenuates streptococcal cell wall—induced arthritis and alters leukocyte activation. *Arthritis & Rheumatism* (48): 3557–3567.
- Kumar R, Gupta YK, R., Singh S, Patil A. (2016). *Glorisa superba* hydroalcoholic extract from tubers attenuates experimental arthritis by downregulating inflammatory mediators, and phosphorylation of ERK/JNK/p-38. *Immunological Investigations* 45(7):603–618, doi:10.1080/08820139.2016.1195406.
- Lawrence T & Gilroy DW (2007). Chronic inflammation: a failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology* 88(2): 85-94.
- Liu, Yanzhi, Cui Y, Chen Y, Gao X, Su Y, Cui L (2015). Effects of dexamethasone, celecoxib, and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in healthy Sprague Dawley rats. *Clinical Interventions in Aging* 10: 1245–1253, doi:10.2147/CIA.S85225.
- Lorentzen JC, Erlandsson H, Mussener Å, Matsson I, Kleinau U, Klareskog L (1995). Specific and long-lasting protection from collagen-induced arthritis and oil-induced arthritis in DA rats by administration of immunogens. *Scand J Immunol* (42):82–89.
- Lorenzo N, Barbera A, Dominguez MC (2012). Therapeutic effect of an altered peptide ligand derived from heat shock protein 60 by suppressing of inflammatory cytokines secretion in two animal models of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 45(6):449–459.
- Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem* (395):203–230.
- Malmström, Vivianne, Catrina A, Klareskog L (2017). The Immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nature Reviews Immunology* 17(1): 60–75, doi:10.1038/nri.2016.124.
- Martínez W, Ospina LF, Granados D, Delgado G (2010). *In vitro* studies on the relationship between the anti-inflammatory activity of *Physalis peruviana* extracts and the phagocytic process. *Immunopharm Immunotoxicol* 32:63–73. 10.3109/08923970903143957.
- McInnes IB, Schett G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat*

- Rev Immunol* (7):429–442.
- McInnes IB, Schett G (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 36(5):2205–2219.
- Miao C, Yang Y, He X, Li , Huang Y, Li J (2013). Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal* (2): 2069–2078. (10.1016/j.cellsig.2013.04.002).
- Moudgil KD, Kim P & Brahn E (2011). Advances in rheumatoid arthritis animal models. *Current Rheumatology Reports* 13(5): 456-463.
- Naik SR, Wala SM (2014). Arthritis, a complex connective and synovial joint destructive autoimmune disease: animal models of arthritis with varied etiopathology and their significance. *Journal of Postgraduate Medicine* 60(3):309–317.
- Palozza P, Parrone N, Catalan A, Simone R (2010). Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. *Curr Med Chem* 17:2547–2563. doi: 10.2174/092986710791556041.
- Raimund WK, Rolf B , Bruno S, Ernesta P (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research* 2(3): 189-202.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15(6):252–259.
- Scholz S., Thomas M (2014). Modeling rheumatoid arthritis using different techniques - a review of model construction and results. *Health Economics Review* 4(1): 1–16, doi:10.1186/s13561-014-0018-2.
- Schwab JH, Anderle SK, Brown RR, Dalldorf FG, & Thompson RC (1991). Pro- and anti-inflammatory roles of interleukin-1 in recurrence of bacterial cell wall-induced arthritis in rats. *Infection and Immunity* 59(12): 4436-4442.
- Snehalatha U, Anburajan M, Venkatraman B, Menaka M (2013). Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model: comparison of thermography and histopathology. *Zeitschrift Fur Rheumatologie* 72(4):375–82, doi:10.1007/s00393-012-1083-8.
- Sokolove J & Lepus CM (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 5(2): 77-94.
- Spoerl D, Duroux-Richard I, Louis-Plence P, Jorgensen C (2013). The role of miR-155 in regulatory T cells and rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology* 148(1):56–65. doi:

- 10.1016/j.Clim.2013.03.010.
- Stahn C, Löwenberg L, Hommesc DW, Buttgerit F (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275(1-"): 71–78, doi:10.1016/j.mce.2007.05.019.
- Steen-Louws C, Hartgring S, Popov-Celeketic J, Lopes AP, de Smet M, Eijkelkamp N, Lafeber F, Hack CE, Van Roon J (2018). IL4-10 fusion protein: a novel immunoregulatory drug combining activities of interleukin 4 and interleukin 10. *Clinical and Experimental Immunology* 195(1): 1-9.
- Stünkel KG, Theisen P, Mouzaki A, Diamantstein T & Schlumberger HD (1988). Monitoring of interleukin-2 receptor (IL-2R) expression in vivo and studies on an IL-2R-directed immunosuppressive therapy of active and adoptive adjuvant-induced arthritis in rats. *Immunology* 64(4): 683-689.
- Uriel M (2008). Animal models in rheumatoid arthritis. *Reumatología Clínica (English Edition)* 4(4):129–131, doi:10.1016/S2173-5743(08)70174-6.
- Vallières M, du Souich P (2010). Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 18:S1–S6.
- Vingsbo C, Jonsson R & Holmdah, R (1995). Avridine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes. *Clinical and Experimental Immunology* 99(3): 359-363.
- Waksman BH (2002). Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology* 56(1):12–34. doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01106.x.
- Wang D, Chang Y, Wu Y, Zhang L, Yan S, Xie G, Qin Q, Jin J, Wang W, Fang J, Wei W (2011). Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis *Clinical and Experimental Immunology* 163(2):225–234, doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04293.x.
- Webb DR (2014). Animal models of human disease: Inflammation. *Biochemical Pharmacology* 87(1):121–130, doi:10.1016/j.bcp.2013.06.014.
- Westlund KN, Zhang L, MA F, Oz HS (2012). Chronic inflammation and pain in a tumor necrosis factor receptor (TNFR) (P55/P75-/-) dual deficient murine model. *Translational Research* 160(1):84–94, doi:10.1016/j.trsl.2011.10.003.
- Whiteside G, Pomonis J, Kennedy J (2013). An industry perspective on the role and utility of snimal models of pain in drug discovery. *Neuroscience Letters* 557(Dec): 65–72, doi:10.1016/j.neulet.2013.08.033.
- Wu SJ (2006). Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-

- inflammatory activities of *Physalis peruviana*. *Journal of Ethnopharmacology* (108): 3407–3413, doi:10.1016/j.jep.2006.05.027.
- Zhang C, Zhang Z, He X, Yang X, Wu H, Lin B, Jiang C, Wang J, Yu C, Yang Z, Wang C (2014). Antioxidant effects of *Genkwa flos* flavonoids on Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* (153): 3 793–800, doi:10.1016/j.jep.2014.03.046.
- Zhang W (2014). Protective effect of *asarum* extract in rats with adjuvant arthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8(5):1638–1642, doi:10.3892/etm.2014.1941.
- Zhao L, Haiyan L (2012). Newcastle disease virus: a promising agent for tumour immunotherapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39(8):725–730, doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05662.x.
- Ziskoven C (2011). Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 89(7): 455–466, doi:10.1139/y11-055.