

Modificaciones clínicas en un modelo experimental de sinovitis aguda en equinos

Verde, Claudio Raul*; Simpson, María Inés**Frigoli, A***; Landoni, M.F.*****

*Medico Veterinario, doctorando de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Trabajos Practicos. Servicio Central de Cirugia. (FCV-UNLP)

**Medico Veterinario, doctorando de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Trabajos Practicos. Catedra de Biofisica (FCV-UNLP)

*** Licenciada en Química. Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Trabajos Practicos. Catedra de Biofisica (FCV-UNLP)

**** Med.Vet; Dr Cs Veterinarias; PhD. Investigador CONICET. Profesor Adjunto Catedra de Farmacologia FCV-UNLP. Presidente de la Asociacion Argentina de Farmacologia Veterinaria.



FCV. UNLP. Calle 60 y 118 cc 296 (1900) La Plata. Argentina

Contactar en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/landoni>

RESUMEN

Se describe un modelo experimental para el estudio de la artritis en equinos que consistió en la aplicación intracarpal de 0.01 µg/kg de lipopolisacáridos (LPS). Se aplicó un diseño experimental de cross-over con dos períodos. Los parámetros clínicos comparados entre los grupos tratado y control incluyeron temperatura corporal, largo de paso, circunferencia carpiana, ángulo carpiano en reposo y ángulo carpiano en flexión.

Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratado con LPS y control fueron evidentes entre 1 y 48 h post-inyección en la temperatura corporal y entre las 2 y 48 h en el largo de paso y el ángulo carpiano en flexión. Modificaciones más tardías fueron observadas en la circunferencia carpiana y en el ángulo carpiano en reposo, entre las 4 y 48 h y entre las 8 y 24 h post-administración de LPS, respectivamente. El ángulo carpiano en reposo fue el único parámetro que retornó a los valores basales al final de la experiencia; sin embargo, los animales no mostraron secuelas del experimento transcurridas 72 h.

El presente modelo no afectó en forma importante el bienestar animal y sería útil para el estudio de drogas antiartríticas.

Palabras clave: equino; artritis; sinovitis; endotoxina

SUMMARY

An experimental model for studying arthritis in horses, consisting on intracarpal administration of LPS at a dose rate of 0.01 µg/kg, is described. A two-ways cross over design was applied. Evaluated clinical end-points on LPS-treated and control groups were body temperature, stride length, carpal circumference, rest angle flexion and maximal carpal flexion.

Statistically significant differences between LPS-treated and control groups were observed between 1 and 48 h post-injection on body temperature and between 2 and 48 h on stride length and maximal carpal flexion.

Modifications on carpal circumference, as well as, on rest angle flexion were observed later on time (between 4-48 h and 8-24 h post LPS administration, respectively). Rest angle flexion was the unique parameter returning to baseline values at the end of the study. However, 72 h after LPS-injection none of the animals showed any sequel of the experiment. The present experimental model has not affected animal welfare, being applicable for the study of antiarthritic drugs.

Key Words: Horses, arthritis, synovitis, endotoxin.

INTRODUCCIÓN

El problema clínico más relevante que padecen los equinos de deporte es la lesión en sus miembros siendo la enfermedad articular una causa común de claudicación.

Distintos modelos experimentales de artritis en equinos han sido aplicados tanto para el estudio del proceso inflamatorio articular como para evaluar el comportamiento de algunas drogas (1,6,14,16). Estos modelos pueden dividirse en aquellos que aplican irritantes como carragenina (10) o adyuvante de Freund (14) y los quirúrgicos (2,3). Estos últimos tienen la desventaja de producir lesiones permanentes que afectan el bienestar del animal por el resto de su vida. Por otro lado, los modelos que usan irritantes provocan lesiones, aunque no permanentes, de larga duración y lenta evolución, haciéndolos inaplicables para el estudio de los procesos articulares agudos. La inyección intracarpal de lipopolisacáridos permitió crear un modelo más humano de artritis experimental en equinos, de corta duración y evolución benigna. La inyección intraarticular de LPS puede provocar modificaciones clínicas sistémicas como pirexia, depresión y anorexia, aunque estas manifestaciones son claramente dosis dependientes. La utilización de animales experimentales es necesaria para adquirir conocimientos y beneficiar así el desarrollo científico, sin embargo debe establecerse *a priori* un análisis profundo de los posibles logros frente a las alteraciones provocadas en la calidad de vida de los animales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar un modelo de artritis experimental consistente en la administración intraarticular de una dosis pequeña de LPS en equinos registrando las modificaciones clínicas producidas. De ésta manera el modelo podría ser utilizado para estudiar las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de distintas drogas, sin provocar lesiones permanentes ni afectar profundamente el bienestar de los animales experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales experimentales seleccionados al azar, fueron seis equinos mestizos, cinco hembras y un macho, clínicamente sanos, de 2 a 9 años de edad con pesos entre 220 y 350 kg. Los equinos permanecieron estabulados y se los alimentó dos veces al día, a las 5 y 17 h con granos de avena (1% de su peso) y heno de alfalfa (2% de su peso); mientras que el acceso al agua fue *ad libitum*. Previo al inicio del estudio se realizó una evaluación clínica general que incluyó un registro de la frecuencia respiratoria y cardíaca, de la temperatura rectal y del color y tiempo de llenado capilar de las membranas mucosas. Un examen del aparato locomotor en particular descartó lesiones preexistentes. Durante un período de dos meses los caballos fueron familiarizados con los elementos de trabajo y con el personal.

Se aplicó un diseño cross-over de dos vías con un período de *wash out* de quince días, siguiendo un modelo de cuadrado latino para que todos los animales recibieran ambos tratamientos. El día previo al comienzo de cada etapa los equinos fueron pesados y la piel de la cara dorsal de sus carpos izquierdos (primera etapa) o derechos (segunda etapa) fue depilada.

Artritis

Durante la primera etapa, a tiempo cero (7 h AM), tres equinos fueron sometidos a una artrocentesis estéril de la articulación intercarpiana izquierda para inyectarlos con una solución que contenía 1µg de lipopolisacáridos (LPS) de E. Coli 055 (Difco Laboratories, Michigan, USA) por ml de solución fisiológica a la dosis de 0.01 µg/kg; mientras que, las articulaciones intercarpianas izquierdas de los otros tres animales fueron inyectadas simultáneamente con solución salina bufferada (control) a la dosis de 1 ml/100 kg de peso. Las modificaciones inducidas en el miembro inyectado fueron evaluadas dentro del establo a través del estudio de cinco parámetros clínicos, obtenidos a tiempo cero (valores basales) y 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h posteriores a la inyección intraarticular en ambos grupos respetando el siguiente orden:

- Temperatura: éste parámetro fue obtenido apoyando un termómetro de máxima de tipo digital con una sensibilidad de 0.1°C sobre la mucosa de la boca. La medición fue registrada en grados centígrados (°C).
- Angulo carpiano en reposo: se obtuvo con un goniómetro, apoyando una rama paralela a la cara lateral del antebrazo y la otra sobre la cara lateral de la caña.
- Circunferencia carpiana: con el miembro a evaluar apoyado, el carpo fue envuelto con una cinta métrica inmediatamente por debajo del relieve más prominente que produce el hueso accesorio del carpo en la cara palmar de la articulación. La medición fue registrada en centímetros.
- Angulo carpiano en flexión: para obtener éste valor se utilizó el goniómetro mencionado anteriormente y colocándolo en la misma posición se lo acompañó lentamente junto a la flexión manual del carpo hasta que el animal manifestó el primer signo de disconformidad con la maniobra (una contracción leve de la musculatura de la espalda).
- Largo de paso: una cinta de papel de 1 metro de ancho y 20 metros de largo fue extendida y adherida sobre un piso de cemento sin ondulaciones. Luego, un trozo rectangular de goma espuma de 5 x 3 x 1 centímetros previamente humedecido en

tinta fue pegado longitudinalmente sobre la muralla del casco en la región de la pinza, de modo que tiñera el papel cuando el miembro se apoyara en el piso. A continuación un asistente tomó al equino del bozal y caminó junto a él hasta cubrir la extensión del papel. Así, la distancia (en metros) entre dos marcas de tinta estableció el largo de un paso. El promedio de los valores obtenidos en toda la cinta de papel (exceptuando el primero y el último) se registró como largo de paso.

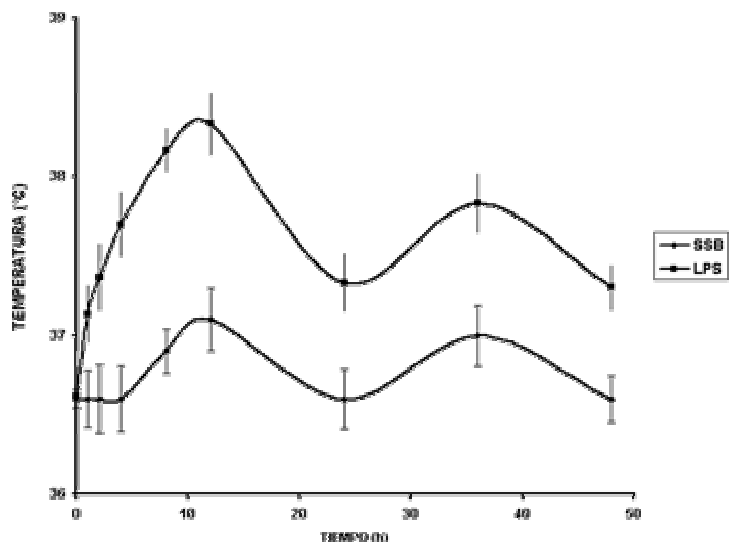
Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo investigador. En la segunda etapa del cross-over, los tratamientos fueron invertidos utilizando la articulación intercarpiana derecha.

La comparación entre los grupos LPS y control se realizó mediante análisis de varianza multifactorial (MANOVA), considerando tratamiento, tiempo, secuencia y período del cross over como fuentes de variación. Para el análisis de la circunferencia carpiiana y el largo de paso los datos fueron normalizados ($x / \text{valor basal}$) debido a las diferencias observadas entre los animales en los registros basales.

RESULTADOS

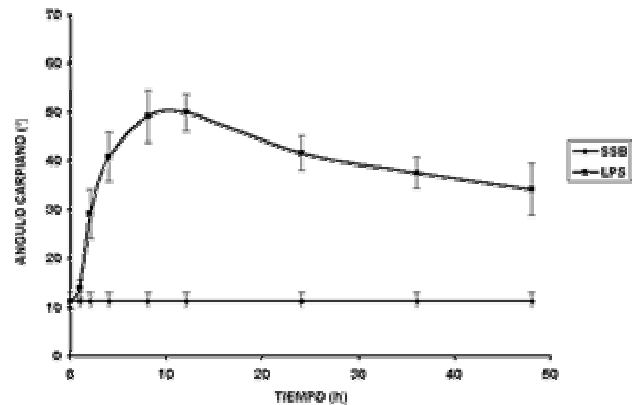
La administración intrarticular de LPS provocó una disminución significativa ($p < 0.05$) del ángulo carpiiano en reposo desde las 8 hasta las 24 h post-LPS en 4 de los 6 animales experimentales (Fig. 1). El valor máximo de disminución se observó a la hora 8 post-LPS. Dos equinos mostraron una tendencia diferente a la del resto, en un caso solo se observó disminución significativa en este parámetro en el registro de la hora 12, mientras que el otro animal no mostró diferencias significativas respecto al grupo control en ninguno de los registros.

FIGURA 1. Modificación del ángulo carpiiano en reposo ($^{\circ}$) en función del tiempo en equinos luego de la administración intrarticular de LPS a la dosis de $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ o solución salina bufferada (SSB).
Media \pm SEM (n=6)



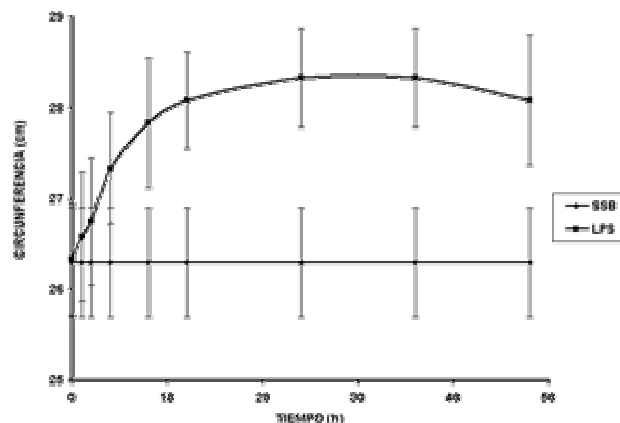
El largo de paso se acortó progresivamente en todos los animales tras la administración de LPS (Fig.2). Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a la hora 2 post-LPS y se mantuvo por debajo del valor del grupo control hasta el último tiempo registrado (48h). La disminución máxima del largo de paso se observó a las 4 horas post-LPS en tres animales, a la hora 8 en dos y a la hora 2 en el restante. Si bien los valores de este parámetro se acercaban progresivamente a los valores del grupo control, se mantuvieron significativamente inferiores hasta el último tiempo de registro.

FIGURA 2. Modificación del largo de paso (cm) en función del tiempo en equinos luego de la administración intrarticular de LPS a la dosis de 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o solución salina bufferada (SSB). Media \pm SEM (n=6)



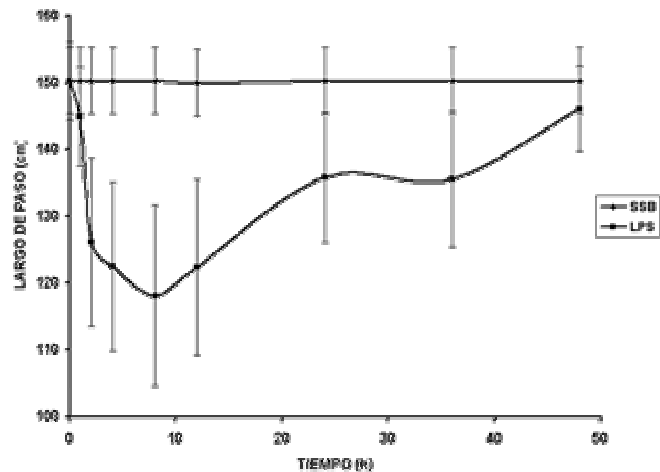
La administración de LPS produjo un aumento significativo ($p < 0.01$) de la circunferencia carpiana a partir de las 4 h post inyección (Fig.3). Esta diferencia se mantuvo hasta las 48 horas en todos los animales experimentales. Una importante variación inter-animal se observó en el tiempo del registro máximo. Siendo éste, 8 h para dos animales, 12 h para dos y 48 h en los dos restantes.

FIGURA 3. Modificación de la circunferencia carpiana (cm) en función del tiempo en equinos luego de la administración intrarticular de LPS a la dosis de 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o solución salina bufferada (SSB). Media \pm SEM (n=6)



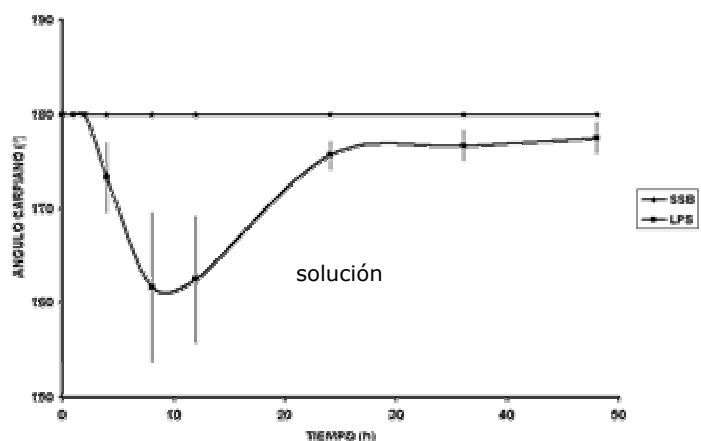
El ángulo carpiano en flexión aumentó en todos los animales tras la administración de LPS (Fig.4). Este aumento fue significativo ($p < 0.01$) a partir de las 2 horas post-LPS y se mantuvo así hasta el registro de las 48 h. Como en el caso de la circunferencia carpiana una importante variación entre los animales experimentales fue observada en el tiempo de registro del máximo aumento, siendo éste 8, 12 y 24 h post-LPS para dos, tres y un animal, respectivamente.

FIGURA 4. Modificación del ángulo carpiano en flexión ($^{\circ}$) en función del tiempo en equinos luego de la administración intrarticular de LPS a la dosis de $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ o solución salina bufferada (SSB). Media \pm SEM (n=6)



La temperatura corporal aumentó a partir de la primera medición en todos los animales del grupo LPS y se mantuvo significativamente elevada ($p < 0.05$) durante todo el estudio (Fig. 5). Los valores máximos fueron obtenidos a las 12 h en cinco equinos y a las 8 h en el restante con un aumento promedio de $1.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

FIGURA 5. Modificación de la temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) en función del tiempo en equinos luego de la administración intrarticular de LPS a la dosis de $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ o solución salina bufferada (SSB). Media \pm SEM (n=6)



DISCUSIÓN

La inyección intracarpiana de LPS provocó en todos los animales experimentales síntomas típicos de un proceso inflamatorio agudo.

Los lipopolisacáridos (LPS o endotoxina) son componentes de la cara externa de la membrana de todas las bacterias Gram negativas. Clásicamente están conformados por tres regiones: el lípido A, un centro de estructura oligosacárido y el polisacárido O (12). Los macrófagos/monocitos (o células de Kupffer en el hígado) son probablemente las principales células que interactúan con LPS. La vía primaria de la respuesta inflamatoria se inicia cuando LPS se fija a la proteína fijadora de lipopolisacáridos (LBP), un miembro de las llamadas proteínas de la fase aguda. Una vez formado, el complejo LPS-LBP interactúa con el receptor CD14 en el macrófago, iniciando la cascada de citocinas pro-inflamatorias: tumor necrosis factor e interleukinas (IL-1, IL-6 e IL-8). Las células primarias en la respuesta a LPS son, como se dijo anteriormente, los macrófagos/monocitos así como los fibroblastos sinoviales. Sin embargo, se ha demostrado en estudios *in vitro* que LPS provoca una estimulación, dosis dependiente, de los condrocitos que conduce a un marcado aumento en la producción de prostaglandina E2 así como de IL-1. Esto último ha sido demostrado en una variedad de especies, entre ellas, equinos (8,9), bovinos (15) y ratas (13), así como en sinoviocitos equinos (7).

En el presente modelo la administración intraarticular de LPS a la dosis de 0.01 µg/kg provocó modificaciones locales importantes con una mínima respuesta sistémica. Esto es consecuencia de la dosis administrada ya que dosis diez veces mayores (4) producen importantes respuestas sistémicas con elevación del 10% en la temperatura corporal así como modificaciones cardiovasculares (taquicardia e hipotensión).

Las modificaciones en los parámetros clínicos analizados en el presente estudio, como largo de paso y ángulo en flexión, son similares a las observadas tras la administración intrarticular de adyuvante de Freund (14). Sin embargo, el uso de irritantes potentes, como carragenina (10) o adyuvante de Freund, provoca respuestas de inicio más lento y mayor duración que las observadas en el presente estudio con LPS.

El aumento observado en la circunferencia carpiana es la consecuencia del incremento de PGE2 inducido por LPS. En el presente modelo, el aumento de la circunferencia carpiana es menor al reportado tras la administración de carragenina (10). Esto sería reflejo de la diferente potencia de los estímulos aplicados. En el modelo que aplica adyuvante de Freund el aumento de la circunferencia carpiana reportado es menor. Es difícil explicar estas diferencias entre irritantes pero probablemente implique una menor inducción de PGE2.

La importante variación inter-animal observada en todos los parámetros clínicos analizados era predecible ya que los parámetros clínicos son en general altamente variables. Las variaciones inter-animal son comunes en todos los modelos de artritis in vivo (5,10,14). La variabilidad propia del modelo debe ser considerada cuando se lo pretenda aplicar al estudio comparativo de drogas antiinflamatorias.

El presente modelo demuestra tener aplicación potencial para el estudio de fármacos antiinflamatorios. Tiene la ventaja de permitir evaluar el efecto analgésico (a través del

ángulo en flexión) así como el efecto antiedematoso (a través de la circunferencia carpiana). Asimismo, permite la aplicación de diseños de cross-over ya que un tiempo de dos semanas entre cada período asegura la ausencia de efectos de carry-over.

Existe un número importante de modelos experimentales para el estudio *in vivo* de los procesos artríticos: quirúrgicos, como la transección del ligamento cruzado anterior (2,3); con irritantes, como adyuvante de Freund (14) o carragenina (10) y endotóxicos como el presente. Cada modelo experimental posee sus ventajas y desventajas, pero quizás la característica más importante a tener en cuenta es el grado y duración de la lesión provocada y como influirá en el bienestar del animal experimental.

El presente modelo cuantificó los signos clínicos que caracterizan un proceso artrítico agudo, por lo tanto demostró ser una herramienta valiosa para el estudio comparativo de fármacos antiinflamatorios y antiartíticos. Asimismo, no deterioró en forma importante ni prolongada el estado general de los animales experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS ME, BILLINGHAM MEJ. Animal models of degenerative joint disease. Curr. topics Pathol. **71**:265, 1982
2. ALTMAN RD, DEAN DD, MUNIZ O. Prophylactic treatment of canine osteoarthritis with glycosaminoglycan polysulfuric acid ester. Arth.Rheum. **32**:759, 1989
3. ALTMAN RD, KAPILA P, DEAN DD. Future therapeutic trends in osteoarthritis. Scand.J. Rheumatol. **577**:37, 1989
4. FIRTH EC, WENSING T, SEUREN F. An induced synovitis disease model in ponies. Cornell Vet. **77**:107, 1987
5. HAWKINS D, MCKAY R, GUM G, COLAHAN T, MEYER J. Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6 and prostaglandin E2 values in horses. Am. J. Vet. Res. **54**:379, 1993
6. KOLD SE, HICKMAN J. An experimental study of the healing process of equine chondral and osteochondral defects. Equine Vet. J. **18**:18, 1986
7. LANDONI MF, FREAN S, FOOT R, LEES P. Effects of flunixin, tolfenamic acid, R(-) and S(+) ketoprofen on the response of equine synoviocytes to lipopolysaccharide stimulation. Equine Vet. J. **28**:468-475, 1996
8. MAY SA, HOOKE RE, LEES P. Equine chondrocyte activation by a variety of stimuli. Br. Vet. J. **148**:389, 1992
9. MAY SA, HOOKE RE, PEREMANS KY, VERSCHOOTEN F, LEES P. Prostaglandin E2 in equine joint disease. Vlaams Diergeneeskd Tijdschr **63**:187, 1994
10. OWENS J, KAMERLING S, STANTON S, KEOWEN M, PRESCOTT-MATHEWS J. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. Am. J. Vet. Res. **57**:866, 1996
11. PALMER JL, BERTONE AL. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. Equine Vet. J. **26**:492, 1994
12. POXTON IR. Endotoxin in human disease. In: Therapeutics. AoVPa, ed. Endotoxin and NSAIDs in horses. Harrogate. UK: , 1999: 3.
13. RATH NC, ORONSKY AL, KERWAR SS. Synthesis of interleukin 1-like activity by normal rat chondrocytes in culture. Clin. Immunol. Immunopathol. **47**:39, 1988

14. TOUTAIN PL, AUTEFAGE A, LEGRAND C, ALVINERIE M. Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in horses: Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. J. Vet. Pharmacol. Therap. **17**: 459, 1994.
15. TOWLE CA, TRICE ME, OLLIVIERRE F, AWBREY BJ, TREADWELL BV. Regulation of cartilage remodelling by IL-1 evidence for autocrine synthesis of IL-1 by chondrocytes. J. Rheumatol. **14**:1, 1987
16. TULAMO RM, BRAMLAGE LR, GABEL AA. The influence of corticosteroids on sequential clinical and synovial fluid parameters in joints with acute infectious arthritis in the horse. Equine Vet. J. **21**:332, 1989

Escrito recibido el 22/10/04, nº de referencia 020513_REDNET. Enviado por uno de sus autores, [landoni](#), miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#). Publicado en [REDNET®](#) el 01/02/04.

(Copyright) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDNET®](#), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](#) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](#) - [www.veterinaria.org](#) y [REDNET®](#) [www.veterinaria.org/revistas/redvet](#) y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#)