

# Descripción Histológica de los Daños Ocasionados por Monoiodo Acetato de Sodio en Articulación Humeral de Rata

## Histologic Description of Monosodium Iodoacetate Damage in Rat Humeral Joint

Claudia Andrea Vargas<sup>1,2</sup>; Bélgica Vásquez<sup>3</sup>; Carlos Veuthey<sup>4</sup>;  
Mariano del Sol<sup>1,5</sup>; Cristian Sandoval<sup>5</sup> & Nicolás Ernesto Ottone<sup>1,4,5</sup>

VARGAS, C. A.; VÁSQUEZ, B.; VEUTHEY, C.; DEL SOL, M.; SANDOVAL, C. & OTTONE, N. E. Descripción histológica de los daños ocasionados por Monoiodo Acetato de Sodio en articulación humeral de rata. *Int. J. Morphol.*, 37(4):1551-1556, 2019.

**RESUMEN:** La inyección con monoiodo acetato de sodio (MIA) es ampliamente utilizada para producir osteoartritis en diversas articulaciones. El objetivo fue describir los daños histológicos provocados por MIA en la articulación humeral de rata. Se inyectó 0,1 mL de mezcla de 0,5 mg de MIA disuelto en 10 mL de solución fisiológica en la articulación humeral izquierda de 21 ratas Sprague-Dawley. Como control se utilizó la articulación derecha de cada rata. Se realizó la eutanasia a las 4, 8 y 12 semanas post inyección en grupos de 7 ratas. Los miembros mantenidos en formalina tamponada al 10% fueron descalcificados con EDTA por tres meses. Para la evaluación histológica se realizó la inclusión en parafina y se realizaron cortes coronales de 5 µm de espesor, para posterior tinción con azul de toluidina. En el cartílago sano, se observó una superficie lisa sin fisuras, todas las células de las zonas del cartílago se observaron normales. Se observaron cambios en el cartílago articular a partir de las 4 semanas post inyección, los condrocitos de la zona radial hipertróficos con gran producción de proteoglicanos. A las 12 semanas post inyección, se observa un gran deterioro, el espacio articular se ve disminuido, La superficie del cartílago se observa con fisuras y grietas que llegan hasta la zona radial. Las células alrededor de estas fisuras han desaparecido. Se observa una pérdida prominente de proteoglicanos debido a la débil tinción con azul de toluidina. La inyección articular con MIA produce lesiones similares a la OA. La gran ventaja de la OA inducida por MIA, es la facilidad de su aplicación y la rapidez en la progresión de OA.

**PALABRAS CLAVE:** Osteoartritis; Monoiodo acetato de sodio; Histología; Rata; Articulación humeral; Cartílago articular.

## INTRODUCCIÓN

La Osteoartritis (OA) es una enfermedad que se caracteriza por la degradación progresiva del cartílago articular, lesiones del hueso subcondral, inflamación y dolor (Cifuentes *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2012). Después de la osteoartritis de cadera y rodilla, la enfermedad degenerativa de la articulación humeral (AH) es la tercera en frecuencia (Gutiérrez & Ekdahl, 2014).

La inyección con MIA es ampliamente utilizada para producir OA en la articulación de la rodilla (Guingamp *et al.*, 1997), en mandíbula (Wang *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2017), pero la información científica sobre estudios de la inducción de OA por MIA en la articulación humeral de ratas, es escasa. La gran ventaja de la OA inducida por MIA,

en comparación a la OA espontánea o generada por otros mecanismos (cirugía, trauma, etc.), es la facilidad en su aplicación y rapidez en el desarrollo de OA. La modificación de la concentración de MIA permite la modulación de la progresión y severidad de las lesiones articulares. Por lo que el estudio de Wang *et al.* estableció una dosis de MIA de 0,5 mg definida como la mínima dosis efectiva para producir las lesiones de OA en ratas.

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un protocolo de osteoartritis (OA) inducida por monoiodo acetato de sodio en un modelo de rata para describir los daños histológicos provocados por OA en la articulación humeral del animal.

<sup>1</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>2</sup> Departamento de Educación Física, Deportes y Recreación, Facultad de Educación, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile

<sup>4</sup> Laboratorio de Platinación y Técnicas Anatómicas, Centro de Investigación en Ciencias Odontológicas (CICO), Facultad de Odontología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>5</sup> Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Financiamiento: Universidad de La Frontera, Proyecto DIUFRO fondos propios NDFP16-0012

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 21 ratas Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*), hembras, de 200 a 250 g provenientes del Bioterio del Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ) de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Los animales fueron mantenidos con dieta y agua ad libitum, a  $23 \pm 2$  °C con 50-70 % de humedad y ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las directrices establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (2011). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de La Frontera, Chile.

Al inicio de la fase experimental (día 1), los animales fueron anestesiados con ketamina-xilacina y se administró 0,1 mL a cada rata, de mezcla de MIA y solución fisiológica [25 mg de MIA (Iodoacetic acid sodium salt 25 g,

Merck®), disuelto en 10 mL de solución fisiológica] (Wang *et al.*), con una jeringa de tuberculina de 1 mL con aguja calibre 27G x 1/2, en la articulación humeral izquierda, siguiendo el protocolo descrito por Vargas *et al.* (2017). Como control se inyectó la articulación humeral derecha de cada animal con 0,1 mL de solución fisiológica.

Los animales fueron eutanasiados en grupos aleatorios de 7 ratas a la semana 4, 8 y 12 post inyección con tiopental sódico por vía intraperitoneal (180 mg/kg).

**Procesamiento y tinción:** Se obtuvieron los miembros torácicos de cada animal por disección, y se extrajo la articulación humeral junto a los tejidos adyacentes para ser fijados en formalina tamponada al 10 % (1,27 mol/L de formaldehído en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2), por 48 horas. Posteriormente, las muestras fueron descalcificadas en EDTA tamponado (Merck, Darmstadt, Alemania) al 10 %, por un período de tres meses, deshidratados en una batería

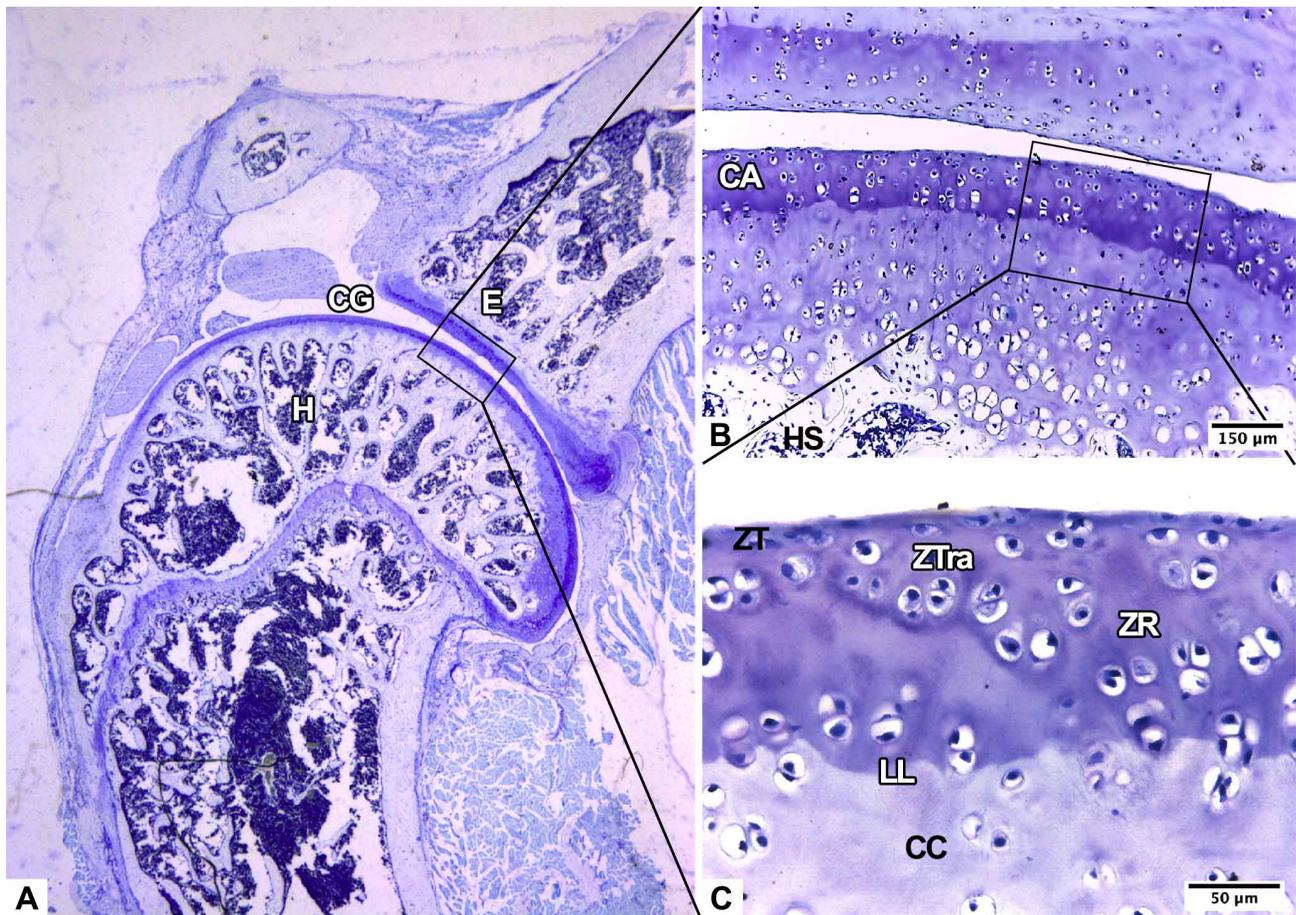


Fig. 1. Control: A. Articulación humeral sana, Tinción con azul de toluidina. Húmero (H), Escápula (E), Cavidad glenoidea (CG). B. Cartílago articular (CA), Hueso subcondral (HS), Hueso compacto (HC) y hueso esponjoso (HE). C. Zona tangencial (zT), zona transicional (zTra) con presencia de células indiferenciadas y algunos condrocitos esféricos, zona radial (zR) de mayor grosor con condrocitos en lagunas organizadas en grupos isogénicos y abundante matriz, línea limitante (LL) definida, cartílago calcificado (CC) condrocitos hipertróficos y una matriz con menor tinción con azul de toluidina, hueso subcondral (HS).

de alcoholes ascendentes e incluidos en parafina Paraplast (Histosec® pastillas, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Los bloques fueron cortados a 5 µm de espesor con disposición latero-medial, cortes coronales, estandarizados por el tendón de la cabeza larga del bíceps, en un micrótopo (Leica® RM2255, Wetzlar, Alemania). Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina, para análisis histológico.

## RESULTADOS

**Grupo control (C):** En el grupo C, el cartílago articular de la cabeza del húmero presentó un aspecto dentro de límites normales. Estaba formado superficialmente por una zona tangencial delgada, luego una zona transicional, también delgada, con presencia de células indiferenciadas y algunos condrocitos esféricos; más profundamente presentaba una zona

radial de mayor grosor con condrocitos en lagunas organizadas en grupos isogénicos y abundante matriz. La línea limitante se encontraba definida y el cartílago calcificado se caracterizaba por presentar condrocitos hipertroficados y una matriz con menor tinción con azul de toluidina. El tejido óseo subcondral, era una delgada capa de hueso tipo compacto y más profundamente hueso de tipo esponjoso, en cuyos espacios medulares predominaban los elementos sanguíneos (Fig. 1).

**Grupo con osteoartritis a las cuatro semanas (OA4):** El cartílago articular presentó menor grosor y reducción de la tinción con azul de toluidina comparado con el grupo C, y la conformación de sus capas eran menos evidentes. La zona tangencial se disponía regularmente y de manera focal presentaba pequeñas abrasiones. La zona transicional era poco evidente y con menor celularidad que el grupo C. En la zona radial se observó menor densidad de condrocitos, los condrones se presentaron aislados o distribuidos en peque-

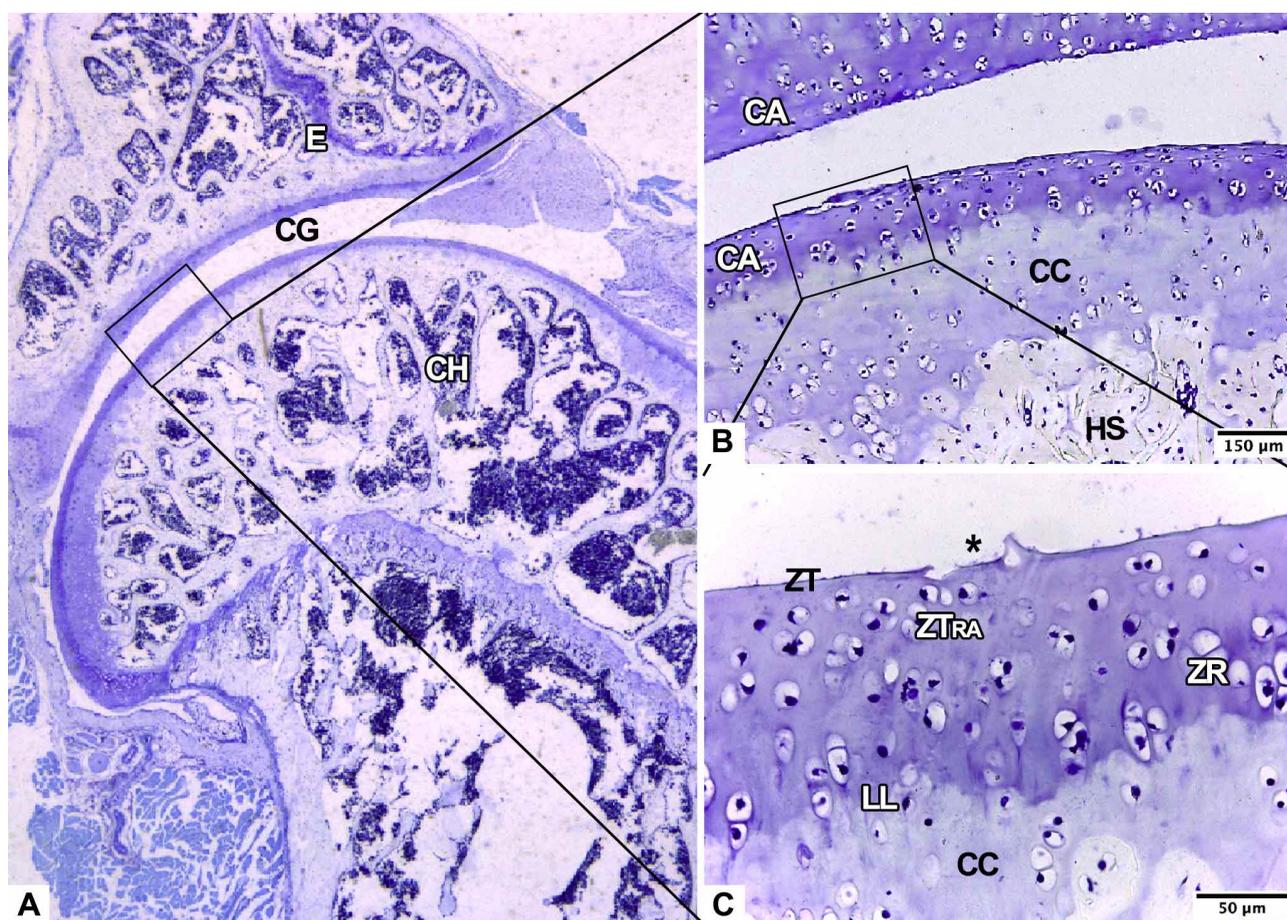


Fig. 2. Droga 4 semanas. A. Articulación humeral con MIA, Tinción con azul de toluidina. Húmero (H), Escápula (E), Cavidad glenoidea (CG). B. Cartílago articular (CA) cartílago presentó menor grosor y reducción de la tinción con azul de toluidina, Hueso subcondral (HS), Hueso compacto (HC) y hueso esponjoso (HE). C. conformación de capas menos evidentes, zona tangencial (zT) de manera focal presentaba pequeñas abrasiones (\*), zona transicional (zTra) poco evidente y con menor celularidad que el grupo Control, zona radial (zR) menor densidad de condrocitos, los condrones se presentaron aislados o distribuidos en pequeños complejos, línea limitante (LL) definida. Cartílago articular y el cartílago calcificado presentó condrocitos hipertroficados necróticos rodeados por una matriz calcificada (Ø).

ños complejos. La línea limitante era evidente en toda la extensión del cartílago articular y el cartílago calcificado presentó condrocitos hipertróficos necróticos rodeados por una matriz calcificada (Fig. 2).

**Grupo con osteoartritis a las 8 semanas (OA8):** En este grupo se observó una discontinuidad focal de la zona superficial del cartílago. La abrasión produjo pérdida de pequeñas porciones de matriz superficial paralelas a la superficie y edema focal. Se observó una disminución de la tinción de la matriz en el tercio superior del cartílago. La zona transicional era poco evidente y de grosor disminuido. En la zona radial se observaron algunos condrocitos pignóticos o muertos; además, menor densidad de condrocitos y condrones distribuidos de manera aislada o formando pequeños complejos. La línea limitante era evidente en toda la extensión del cartílago articular, el cartílago calcificado presentó condrocitos hipertróficos necróticos rodeados por una matriz calcificada y presencia de rarefacción. Se observó un crecimiento de la membrana sinovial hacia la cavidad articular.

**Grupo con osteoartritis a las 12 semanas (OA12):** A las 12 semanas post inyección, se observa un mayor deterioro, el espacio articular se ve disminuido, La superficie del cartílago se observa con fisuras y grietas que llegan hasta la zona radial. Las células alrededor de estas fisuras han desaparecido. Además se observa una invasión de la membrana sinovial fibrosa, hacia el espacio articular (Fig. 3).

El cartílago presentó menor grosor y de manera focal, pérdida de su arquitectura normal; se observó aumento de la vascularización, tanto en el hueso compacto como en el esponjoso, cuya irrigación alcanzaba el cartílago articular calcificado. La zona tangencial del cartílago articular presentó un aspecto irregular con regiones de abrasión y discontinuidad focal. La zona transicional era poco evidente, con menor grosor y celularidad. La zona radial también presentó menor grosor y celularidad, con pérdida focal de la orientación de los condrones (Fig. 4).

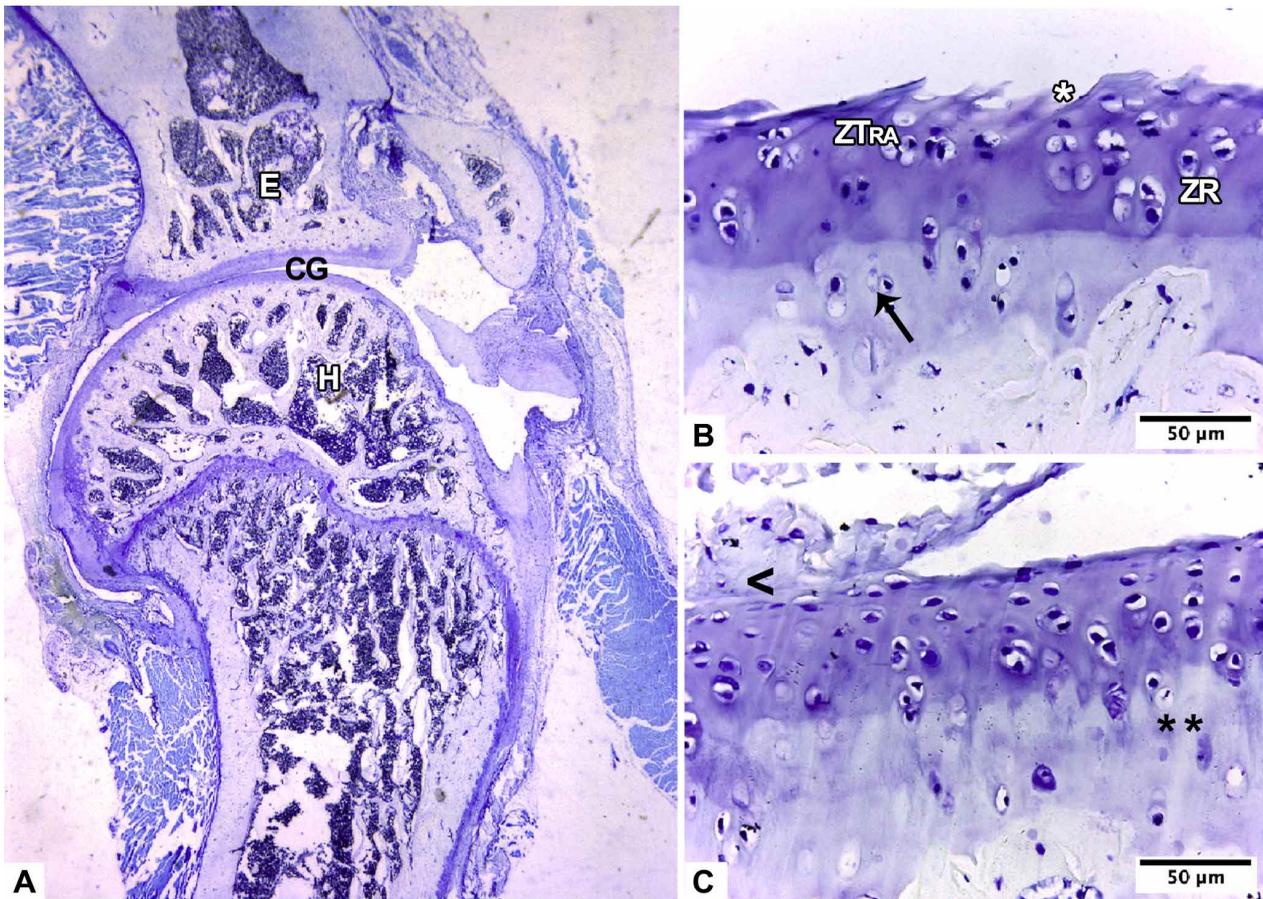


Fig. 3. Droga 8 semanas A. Articulación humeral con MIA, B. Disminución de la tinción de la matriz en el tercio superior del cartílago. Hueso subcondral (HS), Hueso compacto (HC) y hueso esponjoso (HE). Discontinuidad focal de la zona superficial del cartílago (\*). C. Zona tangencial (zT), zona transicional (zTra) poco evidente y de grosor disminuido, zona radial (zR) condrocitos pignóticos o muertos (Ø), línea limitante (LL) evidente en toda la extensión del cartílago articular. Cartílago calcificado presentó condrocitos hipertróficos necróticos rodeados por una matriz calcificada y presencia de rarefacción (\*\*). D Crecimiento de la membrana sinovial hacia la cavidad articular (<).

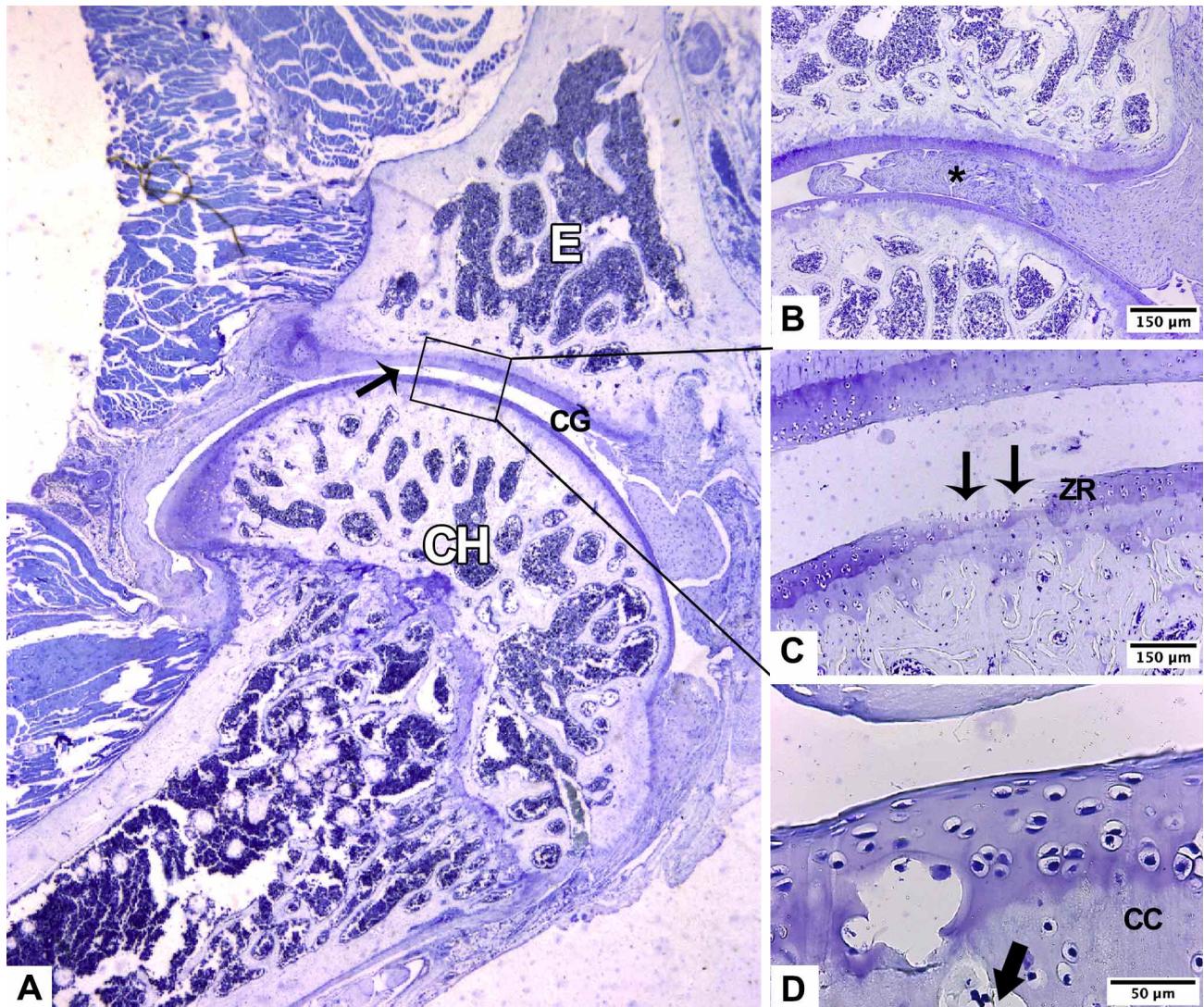


Fig. 4. Droga 12 semanas. A. Articulación humeral con MIA, espacio articular se ve disminuido ( $\emptyset$ ). B. Invasión de la membrana sinovial fibrosa, hacia el espacio articular (\*). C. Discontinuidad focal de la zona superficial del cartílago (\*). La superficie del cartílago de menor grosor, con fisuras y grietas que llegan hasta la zona radial (zR). D. Vascularización, tanto en el hueso compacto como en el esponjoso, cuya irrigación alcanzaba el cartílago articular calcificado.

## DISCUSIÓN

La hipertrofia de los condrocitos ha sido considerada como una característica de la OA progresiva y está captando un interés considerable como mecanismo del fallo articular. La hipertrofia y diferenciación de condrocitos en la OA se encuentra en estadios tardíos de la enfermedad y marca un punto en el proceso de la enfermedad, donde los mecanismos de reparación han fallado (Ni *et al.*, 2016). En nuestro trabajo observamos, a las 8 semanas post inyección de MIA, una hipertrofia transitoria del cartílago articular antes de la erosión.

Los condrocitos hipertrofos estimulan el crecimiento de hueso endocondral. Durante la osificación endocondral en la placa de crecimiento, además liberan factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos desde la red vascular pericondrial y los espacios óseos subcondrales (Bromley *et al.*, 1985). La vascularización de canales en el cartílago articular afectado por OA, está asociado con la nueva formación de hueso en banda alrededor de los canales, extendiéndose desde la placa ósea subcondral. En el margen de la articulación, este proceso de osificación es esen-

cial para el crecimiento de osteofitos; la formación de osteofitos, está asociada con la neovascularización (Hashimoto *et al.*, 1998). En la articulación osteocondral, la osificación alrededor de los canales vasculares contribuye al engrosamiento de la placa ósea subcondral debajo de la onda de avance de cartilago calcificado. Por lo tanto, la invasión vascular es un signo del impedimento del desarrollo del hueso, y en la OA contribuye a un daño articular progresivo (Suri & Walsh, 2012).

La síntesis de proteoglicanos inicialmente se vio disminuida, con el paso del tiempo se encontró aumentada, lo que puede ser el primer signo de la formación de osteofitos (Guingamp *et al.*). Varios autores han atribuido una diferencia sitio específica en anabolismo, entre el área central y periférica después de la exposición a MIA, a las diferencias en las cargas del cartilago o metabolismo de condrocitos (Van Osch *et al.*, 1994 citado en Guingamp *et al.*).

Finalmente, debido a los cambios histológicos que produce la OA, y la similitud comprobada de los daños de OA inducida por MIA, el objetivo de este estudio fue identificar, a través de la administración de MIA, distintos estadios del desarrollo de osteoartritis en la articulación humeral de rata. Se observaron daños progresivos en la articulación humeral de rata, similares a los provocados por OA en humanos, generando así un modelo de inducción de OA en la articulación humeral de rata, que es rápida y progresiva en el tiempo, para la realización de futuros estudios traslacionales de posibles tratamientos en los diversos estadios de la OA.

**VARGAS, C. A.; VÁSQUEZ, B.; VEUTHEY, C.; DEL SOL, M.; SANDOVAL, C. & OTTONE, N. E.** Histologic description of monosodium iodoacetate damage in rat humeral joint. *Int. J. Morphol.*, 37(4):1551-1556, 2019.

**SUMMARY:** Injection with monoiodo sodium acetate (MIA) is widely used to produce osteoarthritis in various joints. The aim of this work was to describe the histological damage caused by MIA in the rat humeral joint; 0.1 mL of 0.5 mg mixture of MIA dissolved in 10 mL of physiological solution was injected into the left humeral joint of 21 Sprague-Dawley rats. As a control, the right joint of each rat was used. Euthanasia was performed at 4, 8 and 12 weeks post injection in groups of 7 rats. The samples maintained in 10 % buffered formalin were descaled with EDTA for three months. For histological evaluation, paraffin inclusion was performed and 5 µm thick coronal cuts were made for subsequent staining with toluidine blue. In the healthy cartilage, a smooth surface was observed, all cells in the cartilage areas were normal. Changes in articular cartilage were observed after 4 weeks post injection, hypertrophic radial chondrocytes with high proteoglycan production. At 12 weeks post injection, a great deterioration was observed, the articular space was diminished. The surface of the cartilage was observed with fissures and cracks that reach the radial zone. The cells around these fissures have disappeared. A prominent loss of proteoglycans was observed due to weak toluidine blue staining.

Joint injection with MIA produced lesions similar to OA. The great advantage of the OA induced by MIA, is the ease of its application and the rapidity in the progression of OA.

**KEY WORDS: Osteoarthritis; Monoiodo sodium acetate; Histology; Rat; Humeral joint; Articular cartilage.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bromley, M.; Bertfield, H.; Evanson, J. M. & Woolley, D. E. Bidirectional erosion of cartilage in the rheumatoid knee joint. *Ann. Rheum. Dis.*, 44(10):676-81, 1985.
- Cifuentes, D. J.; Rocha, L. G.; Silva, L. A.; Brito, A. C.; Rueff-Barroso, C. R.; Porto, L. C. & Pinho, R. A. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. *Osteoarthritis Cartilage*, 18(8):1088-95, 2010.
- Fuentes, R.; Veuthey, C.; Arias, A.; Saravia, D. & Ottone, N. E. Injection in temporomandibular joint of rats. Description of the technical protocol. *Pol. J. Vet. Sci.*, 20(2):207-11, 2017.
- Guingamp, C.; Gegout-Pottie, P.; Philippe, L.; Terlain, B.; Netter, P. & Gillet, P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.*, 40(9):1670-9, 1997.
- Gutiérrez, V. & Ekdahl, M. Artrosis de hombro. *Rev. Med. Clin. Las Condes*, 25(5):732-7, 2014.
- Hashimoto, S.; Ochs, R. L.; Komiya, S. & Lotz, M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 41(9):1632-8, 1998.
- Moon, S. J.; Woo, Y. J.; Jeong, J. H.; Park, M. K.; Oh, H. J.; Park, J. S.; Kim, E. K.; Cho, M. L.; Park, S. H.; Kim, H. Y.; *et al.* Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 20(11):1426-38, 2012.
- Ni, G. X.; Zhou, Y. Z.; Chen, W.; Xu, L.; Li, Z.; Liu, S. Y.; Lei, L. & Zhan, L. Q. Different responses of articular cartilage to strenuous running and joint immobilization. *Connect. Tissue Res.*, 57(2):143-51, 2016.
- Suri, S. & Walsh, D. A. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone*, 51(2):204-11, 2012.
- van Osch, G. J.; van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. Site-specific cartilage changes in murine degenerative knee joint disease induced by iodoacetate and collagenase. *J. Orthop. Res.*, 12(2):168-75, 1994.
- Vargas, C. A.; Ottone, N. E. & Veuthey, C. I. Technical protocol for infiltration of the humeral joint in a rat animal model. *Biomed. Res. (India)*, 28(2):3603-6, 2017.
- Wang, X. D.; Kou, X. X.; He, D. Q.; Zeng, M. M.; Meng, Z.; Bi, R. Y.; Liu, Y.; Zhang, J. N.; Gan, Y. H. & Zhou, Y. H. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate. *PLoS One*, 7(9):e45036, 2012.

Dirección para correspondencia:

Prof. Dr. Nicolás Ernesto Ottone

Laboratorio de Plastinación y Técnicas Anatómicas

Centro de Investigación en Ciencias Odontológicas (CICO)

Facultad de Odontología

Universidad de La Frontera

Av. Francisco Salazar 01145, Casilla 54-D

Temuco - CHILE

Email: nicolas.ottone@ufrontera.cl

Recibido : 06-05-2019

Aceptado: 11-07-2019