

Inflamación sinovial en un modelo experimental de síndrome metabólico en conejo

Synovial inflammation in an experimental model of metabolic syndrome in the rabbit

Martínez-Calatrava MJ, Largo R, Prieto-Potín I, Herrero-Beaumont G.

Laboratorio de Patología Osteoarticular. Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Analizar el efecto del síndrome metabólico (SM) sobre la inflamación sinovial en un modelo experimental en conejo.

Material y métodos: Se probaron tres intervenciones dietéticas diferentes para inducir un modelo experimental de SM, en 21 conejos New Zealand hembra, de 8 meses de edad: 1) alimentación con dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete y agua *ad libitum*; 2) alimentación con dieta normal y agua con 30% de fructosa *ad libitum*; 3) alimentación con dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete y agua con 30% de fructosa *ad limitum*. Los animales se dejaron evolucionar durante 12 semanas y se hizo un seguimiento semanal de peso, glucosa basal, colesterol HDL, triglicéridos. Tras el sacrificio, se tomaron muestras de membrana sinovial para cuantificar el infiltrado macrofágico sinovial mediante inmunohistoquímica.

Resultados: La única intervención dietética con la que conseguimos inducir alteraciones asociadas al SM en los conejos fue alimentándolos con una dieta hiperlipémica. Estos animales, además de presentar hiperglucemia y dislipemia, tenían un infiltrado macrofágico sinovial mayor que el del grupo control.

Conclusión: La alimentación con dieta hiperlipémica induce alteraciones típicas del SM en el conejo, acompañadas de un aumento del infiltrado macrofágico sinovial, lo que sugiere que el macrófago podría desempeñar un papel importante en el inicio y/o la progresión de la artrosis descrita que se asocia con el SM.

Palabras clave:

Síndrome metabólico, modelo animal, dieta, membrana sinovial, macrófago.

Abstract

Objective: To analyze the effect of metabolic syndrome (MS) upon synovial inflammation in an experimental model in the rabbit.

Material and methodology: Three different diets were used to induce an experimental model of MS in 21 female New Zealand rabbits (aged 8 months): 1) diet enriched with 1% cholesterol and 3% peanut oil, with water, *ad libitum*; 2) normal diet, with water, and 30% fructose, *ad libitum*; 3) diet enriched with 1% cholesterol and 3% peanut oil, with water, and 30% fructose, *ad libitum*. The animals were followed-up on for 12 weeks, with weekly monitoring of body weight, basal glucose, HDL-cholesterol and triglycerides. Following sacrifice, synovial membrane samples were collected to quantify the synovial macrophage infiltrate using immunohistochemical techniques.

Results: The only diet to induce alterations associated with MS in the rabbits was the hyperlipidemic diet. These animals, in addition to presenting hyperglycemia and dyslipidemia, showed greater synovial macrophage infiltration than the control group.

Conclusion: A hyperlipidemic diet induces alterations typical of MS in the rabbit, accompanied by an increase in synovial macrophage infiltration.

Key words:

Metabolic syndrome, diet, synovial membrane, macrophage.

Correspondencia

G. Herrero-Beaumont Cuenca
Laboratorio de Patología Osteoarticular. Fundación Jiménez Díaz.
Avenida de los Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid
gherrero@fjd.es

Introducción

La artrosis es una enfermedad multidimensional con una degeneración progresiva del cartílago hialino con alteraciones estructurales de todos los componentes de la articulación afectada, el hueso subcondral, la membrana sinovial, la cápsula articular y los ligamentos [1]. A pesar de su elevada incidencia en los países occidentales, existen campos de desconocimiento en su patogenia, siendo una de las pocas enfermedades prevalentes huérfana aún de opciones terapéuticas eficaces. Se desconocen, en gran medida, los nexos patogénicos existentes entre la obesidad, un factor de riesgo reconocido desde hace años, y el inicio y la progresión de la artrosis. Se ha propuesto que esta relación estuviera entroncada en una urdimbre más compleja en el Síndrome Metabólico (SM) [2][3]. Se ha demostrado que el riesgo a desarrollar artrosis de rodilla se encuentra significativamente aumentado en individuos obesos y que la obesidad induce la degeneración del cartílago por sobrecarga mecánica [1]. Sin embargo, en los últimos años, un número creciente de datos experimentales respalda la existencia de mecanismos de lesión alternativos a los estrictamente mecánicos [4]. En este sentido, se ha encontrado una asociación positiva entre el índice de masa corporal y la artrosis en las manos que han sido decisivos en la búsqueda de mecanismos moleculares adicionales a los meramente mecánicos, capaces de explicar esta asociación.

La obesidad, de acuerdo a los criterios de la «International Diabetes Federation», ocupa una posición central en la patogenia del SM y suele coexistir, en un mismo individuo, con alteraciones metabólicas como dislipemia, resistencia a la insulina, diabetes o hipertensión arterial. Estas alteraciones, tanto individual como conjuntamente son más prevalentes en los enfermos artrósicos [5].

El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el efecto de la obesidad y el SM sobre la inflamación sinovial. Para ello, hemos inducido un modelo de SM en conejos para analizar la correlación entre las alteraciones del SM y la inflamación de la membrana sinovial. La especie elegida para desarrollar el modelo es el conejo porque es una especie que, a diferencia de la rata, tiene un perfil lipídico rico en LDL similar al humano [6].

Material y métodos

Modelo experimental de síndrome metabólico en conejo

Desarrollamos tres modelos experimentales con el fin de analizar cual de ellos genera un SM similar al humano. Para ello llevamos a cabo tres intervenciones dietéticas diferentes en 21 conejos New Zealand hembra, de 8 meses de

edad, (Granja San Bernardo, Navarra, España) que, tras una semana de aclimatación, se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos, grupo 1: alimentación con dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete (2088 kcal/kg, Letica, Barcelona - España) e ingesta de agua *ad libitum*; grupo 2, alimentación con dieta normal (1800 kcal/kg, Letica, Barcelona-España) y agua con 30% de fructosa (Sigma-Aldrich) *ad libitum*; grupo 3: alimentación con dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete e ingesta de agua con 30% de fructosa *ad libitum*, y grupo 4 o grupo control cuyos animales se alimentaron con dieta normal y bebieron agua *ad libitum*.

Los animales se dejaron evolucionar durante 12 semanas, en condiciones de temperatura controlada, en jaulas que les permitían moverse libremente. Durante ese tiempo se hizo un registro periódico de las determinaciones antropométricas y bioquímicas necesarias para valorar el SM, peso (kg), glucosa, colesterol HDL, triglicéridos. Para todas las determinaciones bioquímicas se extrajo sangre de la arteria central de la oreja tras 12 horas de ayuno. Este protocolo fue aprobado por el Comité Ético del IIS Fundación Jiménez Díaz.

Evaluación de lesiones sinoviales

Tras las 12 semanas de evolución, los conejos se sacrificaron y se tomaron muestras de membrana sinovial de la rodilla para realizar estudios histológicos. Las muestras se fijaron con paraformaldehído 4%, durante 24 horas, y posteriormente se embebieron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron a 5 µm, y con las secciones del tejido realizamos una inmunohistoquímica con RAM-11 (RAM11; Dako, Glostrup, Denmark), marcador específico de macrófagos de conejo. El marcaje positivo de RAM-11 fue posteriormente cuantificado utilizando el programa Image-Pro Plus.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS (versión 11.0 para Windows; SPSS, Chicago, IL). Los datos se han expresado como media ± desviación estándar, y se analizaron utilizando los test de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. El nivel de significación establecido fue $p < 0.05$.

Resultados

Los animales que ingirieron una dieta rica en colesterol no ganaron más peso que los animales del grupo alimentado con una dieta estándar (grupo control) (Figura 1). En la semana 7 los animales, a pesar de no presentar obesidad, presentaron alteraciones asociadas al SM como hiperglucemia en ayunas, bajos niveles de colesterol HDL y una tendencia a hipertriglicé-

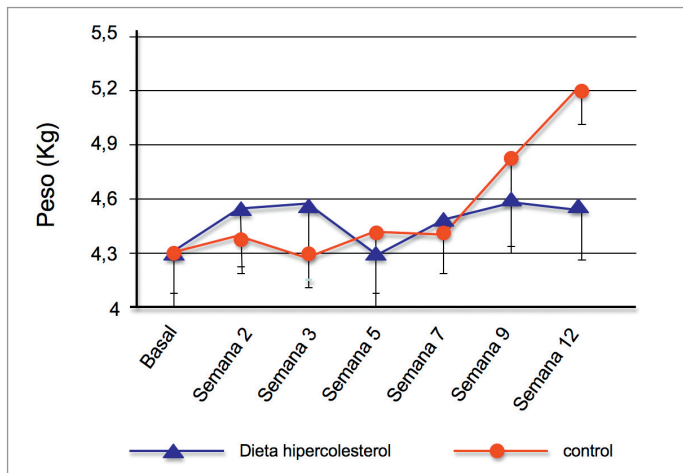


Fig. 1. Evolución del peso en animales alimentados con dieta hipercolesterolémica.

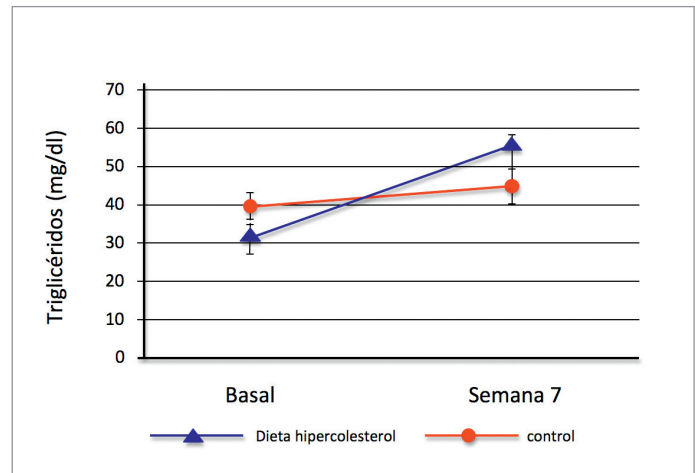


Fig. 4. Evolución de los niveles de triglicéridos en suero en animales alimentados con dieta hipercolesterolémica.

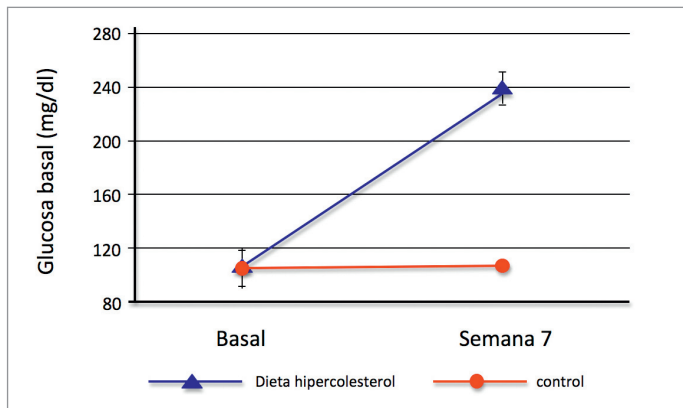


Fig. 2. Evolución de los niveles de glucosa en suero en animales alimentados con dieta hipercolesterolémica.

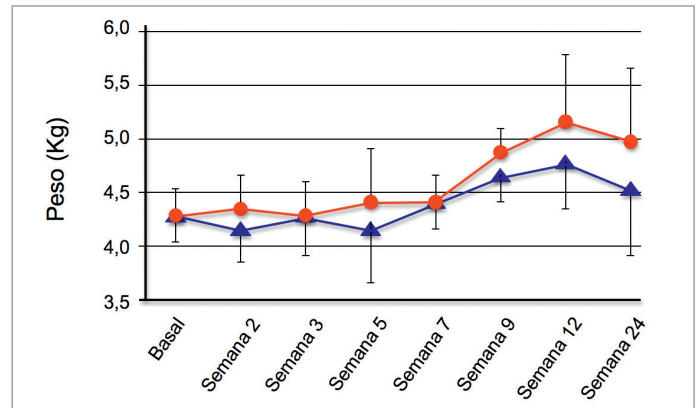


Fig. 5. Evolución del peso en animales que han ingerido agua con 30% de fructosa.

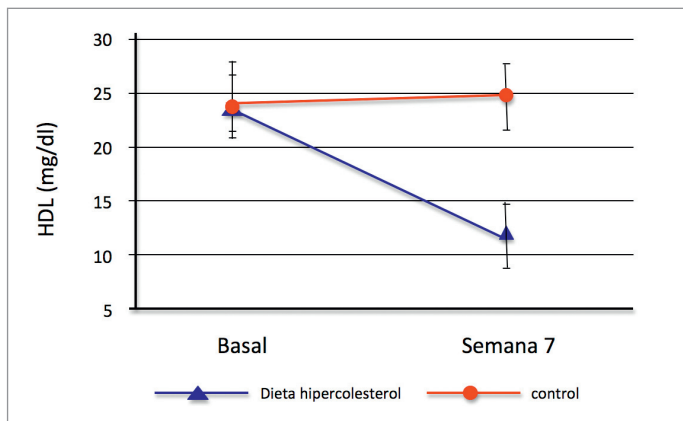


Fig. 3. Evolución de los niveles de colesterol HDL en suero en animales alimentados con dieta hipercolesterolémica.

ceridemia (Figuras 2, 3 y 4). Darles a los conejos una dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete, durante 8 semanas, nos permitiría inducir a los animales un

SM sin obesidad. Este modelo lo utilizamos como control para discernir los efectos producidos por la obesidad de aquellas otras alteraciones del SM que generalmente acompañan a la obesidad.

Los animales que bebieron agua con 30% de fructosa no ganaron más peso que los animales control, en las 12 semanas de evolución del modelo (Figura 5), y no se encontraron diferencias significativas en la glucemia basal (Figura 6), ni en el perfil lipídico (Tabla 1) de los conejos.

La ganancia de peso de los animales alimentados con dieta hipercolesterolémica y agua con fructosa no fue significativamente diferente de la experimentada en el grupo control.

Los niveles de glucosa en ayunas fueron más altos en el grupo problema que en el control en la semana 7, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 7).

En el perfil lipídico (Tabla 2) se observó como el descenso en los niveles de colesterol HDL rozaba la significación estadística ($p = 0,05$) mientras que no se produjeron diferen-

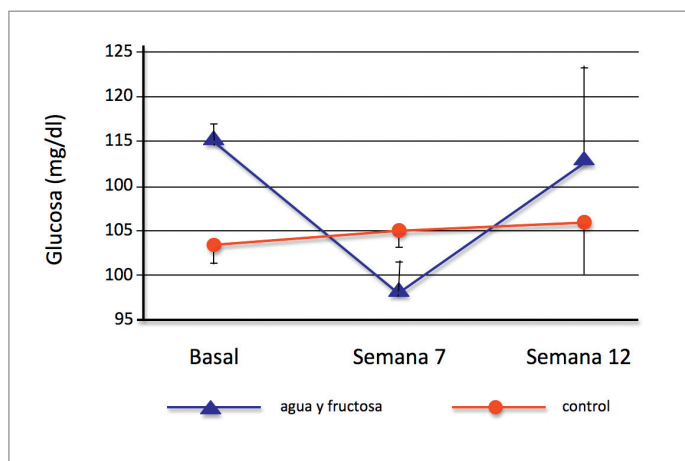


Fig. 6. Evolución de los niveles de glucosa en suero en animales que han ingerido agua con 30% de fructosa.

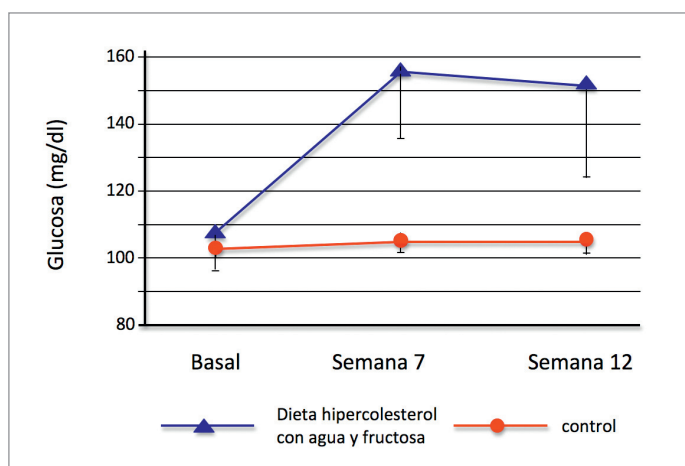


Fig. 7. Evolución de los niveles de glucosa en suero en animales que han comido dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete y han bebido agua con 30% de fructosa.

cias significativas en los niveles de triglicéridos tras 7 semanas de evolución del modelo.

Finalmente, el infiltrado macrofágico de la membrana sinovial fue mayor en los conejos que tomaron dieta hipercolesterolémica que en los conejos controles, aunque la diferencia no fue significativa.

Discusión

Los protocolos no genéticos descritos para inducir SM en conejos son escasos, están pobremente caracterizados y no reflejan la totalidad de las alteraciones metabólicas descritas en el hombre. Por ello, hemos tenido que desarrollar diferentes intervenciones dietéticas para analizar con cual de ellas conseguimos un modelo de SM experimental útil para su aplicación en clínica humana. Nuestros resultados reve-

Tabla 1. Valores de triglicéridos y colesterol HDL en los animales que han ingerido agua con 30% de fructosa

| | Agua + Fructosa | Control |
|--------------------------------|-----------------|--------------|
| HDL basal (mg/dl) | 26.27 ± 0.87 | 24.37 ± 3.43 |
| HDL semana 7 (mg/dl) | 23.63 ± 4.60 | 24.90 ± 1.81 |
| Triglicéridos basal (mg/dl) | 29.33 ± 1.45 | 39.33 ± 2.67 |
| Triglicéridos semana 7 (mg/dl) | 42.66 ± 8.41 | 45.33 ± 5.46 |

Tabla 2. Valores de triglicéridos y colesterol HDL en los animales que han comido dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete y han bebido agua con 30% de fructosa

| | Colesterol + Fructosa | Control |
|--------------------------------|-----------------------|--------------|
| HDL basal (mg/dl) | 19.07 ± 5.32 | 24.37 ± 3.43 |
| HDL semana 7 (mg/dl) | 13.87 ± 2.60* | 24.90 ± 1.81 |
| Triglicéridos basal (mg/dl) | 59.00 ± 7.00 | 39.33 ± 2.67 |
| Triglicéridos semana 7 (mg/dl) | 57.67 ± 15.56 | 45.33 ± 5.46 |

* $p = 0.050$.

lan que la mejor pauta para inducir SM en conejos es la alimentación con una dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete. Los animales alimentados con esta dieta presentan hiperglucemia basal, niveles de colesterol HDL significativamente disminuidos y una tendencia a desarrollar hipertrigliceridemia tras 7 semanas de ingesta de la dieta rica en colesterol. Este es el tiempo mínimo necesario para inducir dichas alteraciones. Prolongar la ingesta de dieta enriquecida con 1% de colesterol y 3% de cacahuete durante más de 12 semanas conlleva una tasa de mortalidad por fallo hepático superior al 50%.

Estos resultados eran de esperar pues la naturaleza herbívora del conejo hace que sea una especie muy sensible al colesterol y la grasa de la dieta. Esto permite que desarrollen hiperlipemia rápidamente con intervenciones dietéticas cortas. A pesar de presentar todas estas alteraciones metabólicas, los conejos no engordaban aunque se les dejase evolucionar 5 semanas más. Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores [7] que utilizando dietas con un contenido en colesterol similar al nuestro no indujeron cambios significativos en el peso corporal. En algunos de estos estudios se ha observado que aunque los conejos no ganan peso, aumentan la cantidad de tejido adiposo visceral y subcutáneo [7]. En estudios posteriores comprobaremos si con la dieta utilizada en este estudio se producen variaciones en el tejido adiposo visceral. Actualmente, no existen proto-

colos dietéticos contrastados para inducir modelos animales de obesidad y los estudios publicados [8][9] obtienen resultados muy dispares que dependen de la especie animal utilizada, la composición exacta de la dieta y el tiempo de evolución de los modelos entre otros aspectos.

A pesar de que la dieta suplementada con fructosa es un modelo aceptado para inducir un SM en ratas y cobayas, no se han realizado hasta el momento estudios similares en conejos. Nuestros resultados no demuestran que la ingesta de agua con 30% de fructosa induzca SM en los conejos. Los resultados del grupo con ingesta combinada 1% de colesterol y 30% de fructosa semejan a los obtenidos en el grupo de conejos alimentados con dieta hipercolesterolémica pero no llegan a alcanzar significación estadística, probablemente porque la fructosa en la bebida sacia y disminuye la ingesta de dieta hipercolesterolémica. En cualquier caso, los resultados indican que los efectos observados se deben al consumo de dieta hipercolesterolémica y no al consumo de fructosa. La relación causal fructosa y SM no se ha aclarado en clínica [10], por lo que habrá que profundizar en el estudio de la participación de la fructosa o los alimentos ricos en fructosa en el origen y desarrollo del SM.

Cada vez existen más datos que sugieren que la artrosis no es solo una enfermedad degenerativa asociada a la edad o a condiciones mecánicas a las que pueden estar sometidas las articulaciones, sino que es una enfermedad metabólica. En este sentido es importante resaltar que la artrosis no solamente se ha asociado a la obesidad, como fuente de sobrecarga mecánica, sino que también se ha asociado a enfermedades metabólicas clásicas como la diabetes, la resistencia a la insulina, la dislipemia o la hipertensión arterial e incluso se ha llegado a sugerir que pueda ser una alteración más del SM [11].

Por otro lado, también ha crecido la evidencia de que la inflamación sinovial influye en la evolución de la enfermedad [12]. Dado que uno de los puntos clave a evaluar cuando se valora la sinovitis en la artrosis es el infiltrado macrófago, hemos analizado dicho infiltrado en la membrana sinovial de conejos sanos y de otros alimentados con una dieta hipercolesterolémica que han desarrollado alteraciones metabólicas asociadas al SM. Nuestros resultados ponen de manifiesto que existe una asociación entre las enfermedades metabólicas inducidas y la presencia de un mayor infiltrado macrófago en la membrana sinovial. A pesar de esto, aún no se conoce la función que tiene el macrófago en la artrosis, por lo que es importante realizar más estudios moleculares y farmacológicos que nos ayuden a avanzar en el conocimiento en este sentido y, posiblemente, a tratar al macrófago como potencial diana terapéutica en la artrosis. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sellam J, Herrero-Beaumont G, Berenbaum F. *Eular compendium* 2009; 444-63.
2. Engström G, Gerhardsson de Verdier M, Rollof J, Nilsson PM, Lohmander LS. C-reactive protein, metabolic syndrome and incidence of severe hip and knee osteoarthritis. A population-based cohort study. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17:168-73.
3. Jonsson H, Helgadóttir GP, Aspelund T, Eiriksdóttir G, Sigurdsson S, Ingvarsson T, et al. Hand osteoarthritis in older women is associated with carotid and coronary atherosclerosis: the AGES Reykjavik study. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1696-700.
4. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 39:71-80.
5. Singh G, Miller JD, Lee FH, Pettit D, Russell MW. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Manag Care* 2002; 8:S383-91.
6. Fan J, Watanabe T. Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2000; 7:26-32.
7. Waqar AB, Koike T, Yu Y, Inouse T, Aoki T, Liu E, et al. High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 2010; 213:148-55.
8. Wu ZH, Zhao SP, Chu LX, Ye HJ. Pioglitazone reduces tumor necrosis factor-alpha serum concentration and mRNA expression of adipose tissue in hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol* 2010; 138:151-6.
9. Zhao S, Chu Y, Zhang C, Lin Y, Xu K, Yang P, et al. Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008; 92:105-11.
10. White JS. Fructose as cause of metabolic syndrome is poorly supported. *Int J Obes (Lond)* 2010.
11. Velásquez MT, Katz JD. Osteoarthritis: another component of metabolic syndrome? *Metab Syndr Relat Disord* 2010; 8:295-305.
12. Katz JD, Agrawal S, Velasquez M. Getting to the heart of the matter: osteoarthritis takes its place as part of the metabolic syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2010; 22:512-9.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.