

DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO EM CAMUNDONGOS DBA/1J ENTRE OS GÊNEROS

DEVELOPMENT OF COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS IN DBA/1J MICE BETWEEN GENDERS

Laura de Lima Xavier^{1,2}, Paula Ramos Viacava^{2,3},
Vivian de Oliveira Nunes Teixeira^{2,3}, Marília Romero Munhoz²,
Priscila Schmidt Lora^{2,3}, Patricia Gnieslaw de Oliveira^{2,3},
Lidiane Isabel Filippin^{2,3}, Ricardo Machado Xavier^{2,3}

RESUMO

Revista HCPA. 2012;32(4):436-442

¹ Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

² Laboratório de Doenças Autoimunes e Infecciosas, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

³ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Contato:

Paula Ramos Viacava
paulaviacava18@hotmail.com
Porto Alegre, RS, Brasil

Introdução: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória sistêmica de etiologia desconhecida. Modelos animais de artrite são extremamente úteis para o estudo da fisiopatologia da doença e de novas terapias.

Objetivo: Considerando a predominância da AR em mulheres e escassez de estudos sobre influência do sexo no desenvolvimento da artrite experimental, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do sexo no desenvolvimento clínico da artrite experimental induzida por colágeno do tipo II (CIA).

Métodos: Camundongos DBA1J foram divididos em machos e fêmeas, ambos n=6. CIA foi induzida por duas injeções intradérmicas com colágeno no dia zero e 18. Escore clínico da artrite e do edema articular foram avaliados diariamente por 10 dias após o desenvolvimento da doença.

Resultados: A evolução do escore clínico não demonstrou diferença entre os machos e fêmeas. O escore clínico avaliado separadamente - patas dianteiras e traseiras, apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) – patas traseiras dia 5 (machos $5,8 \pm 1,1$; fêmeas $3,1 \pm 1,8$ - $p < 0,05$). Entretanto, o edema articular foi significativamente maior nos machos ($p < 0,001$) no dia 5 (machos $4,5 \pm 0,4$; fêmeas $3,8 \pm 0,5$ - $p < 0,05$).

Conclusões: Apesar de não serem claras as diferenças entre machos e fêmeas na CIA em camundongos, a maioria dos pesquisadores da área optam por trabalhar com machos. Como em humanos, acredita-se na influência da genética e dos hormônios no desenvolvimento da CIA. Conclui-se que a diferença encontrada no desenvolvimento da artrite experimental entre machos e fêmeas é um parâmetro a ser avaliado de acordo com o tipo de estudo a ser realizado no modelo de CIA.

Palavras-chave: Artrite; semelhanças entre os gêneros; artrite induzida por colágeno

ABSTRACT

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory autoimmune disease of unknown etiology. Animal models of arthritis are extremely useful to investigate the pathophysiology of the disease and its new therapies.

Aim: Considering that RA affects predominantly women, and acknowledging the lack of studies about the influence of gender in the development of experimental arthritis, the objective of this study was to assess the impact of gender on the clinical development of type II collagen-induced arthritis (CIA).

Methods: Animals were divided in two groups (male and female), both $n = 6$. CIA was induced using intradermal injections with collagen on day zero and 18. Clinical score of arthritis and joint edema were evaluated daily for 10 days after the onset of the disease.

Results: Clinical score showed no difference between males and females. The clinical score assessed separately – front and rear paws, showed a significant difference ($p < 0.001$) – rear paws on day 5 (males 5.8 ± 1.1 ; females 3.1 ± 1.8 , $p < 0.05$). However, joint edema was significantly larger ($p < 0.001$) on day 5 (males 4.5 ± 0.4 ; females 3.8 ± 0.5 ; $p < 0.05$).

Conclusion: Although the differences between male and female mice with CIA are not clear, most researchers choose to work with males. Similarly to humans, genetics and hormones seem to have an influence on the development of CIA. In conclusion, the difference in the development of experimental arthritis between males and females should be assessed according to the type of study to be conducted using a CIA model.

keywords: *Arthritis; gender similarities; collagen-induced arthritis*

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica de etiologia desconhecida, que leva à destruição das articulações e deformidades por erosão do osso e cartilagem (1). Afeta mulheres três vezes mais do que homens e sua incidência aumenta com a idade.

Em geral a AR acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas, como rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade. Também ocorre significativa diminuição da expectativa de vida, entre cinco a dez anos (2).

Modelos animais têm se mostrado uma ferramenta adequada para o estudo da fisiopatologia da AR (3). A artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos é um modelo experimental muito utilizado que compartilha características clínicas com a AR, tais como dor, edema, dano articular e perda funcional (4). Além disso, apresenta semelhanças imunológicas envolvendo altos níveis de autoanticorpos e ativação de células T específicas para colágeno. Histologicamente, a CIA é caracterizada por uma sinovite intensa que corresponde precisamente com as primeiras manifestações clínicas da artrite. Alguns

dias após o início da doença observa-se a invasão do osso subcondral por tecido proliferativo (pannus) e degradação da cartilagem articular, seguida por um processo lento de fibrose e anquilose das articulações afetadas.

Apesar da maior prevalência da AR em mulheres, no modelo animal de CIA há indicação de uso tanto de camundongos machos como de fêmeas (5). No entanto observa-se na literatura uma predominância de experimentos empregando apenas camundongos machos. Uma das justificativas para isso seria os achados de Holmdahl onde observou-se uma maior incidência no desenvolvimento da CIA em machos (6,7). Portanto, existe um conflito na literatura a respeito da similitude no desenvolvimento da doença entre machos e fêmeas, resultado da escassez de estudos comparativos. O objetivo deste trabalho foi comparar o desenvolvimento clínico da artrite induzida por colágeno bovino tipo II entre camundongos DBA/1J machos e fêmeas.

MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos DBA1/J (8-12 semanas, peso médio 20 g). Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (CP-

HCPA) durante o experimento, em caixas plásticas de 30x20x12 cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 18 e 22°C. A água e a ração eram administradas *ad libitum*. Este estudo obedeceu à Legislação Brasileira e do Código Estadual de Proteção aos Animais, (Lei 11794/ 2008), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática (8).

Grupos e delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, machos e fêmeas (n=6). A artrite foi induzida por colágeno bovino tipo II (CIA) segundo Brand et al. (5). Os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano e imunizados com de uma emulsão de 50 µL contendo volumes iguais de colágeno bovino tipo II (2 mg/ml) e adjuvante completo de Freund (CFA) por injeção intradérmica a uma distância de 1,5 cm da base da cauda no dia zero. O reforço da imunização (booster) foi realizado no 18º dia, para garantir a indução com uma alta incidência de CIA. Utilizou-se a mesma concentração de colágeno bovino do tipo II, no entanto, foi emulsificado com adjuvante incompleto de Freund (IFA) para esta imunização. Os animais foram anestesiados como na primeira imunização e a injeção é novamente intradérmica na base cauda, porém numa parte mais distal ao primeiro local da injeção. Os animais foram acompanhados por 10 dias após o desenvolvimento da doença, e sacrificados por deslocamento cervical.

Sistema de avaliação do escore clínico

Os animais foram monitorados diariamente durante todo o período experimental por examinadores cegados para os grupos, para análise dos sinais clínicos da artrite através do escore de gravidade, como segue: 0 – sem sinais de eritema ou edema; 1 – eritema e edema leve (tarsos ou metatarsos); 2 – eritema e edema moderado (tarsos e metatarsos ou tarsos e tornozelo); 3 – eritema e edema severo (metatarsos a tornozelo) e 4 – todas as articulações afetadas com perda da função (anquilose). O escore total é um somatório dos escores nas 4 patas a partir do início da doença (escala de 0 a 16) (9).

Avaliação do edema de pata

No modelo em estudo, a medida laterolateral da pata do camundongo indica o seu grau de inflamação. Essa medida do edema das patas posteriores foi realizada diariamente após o primeiro sinal clínico, durante todo o experimento, por paquímetro digital Mitutoyo (Sul Americana Ltda, Suzano – São Paulo).

Análise estatística

O tamanho amostral foi definido de acordo com os modelos encontrados na literatura (10,11). Os dados quantitativos gerados são descritos em médias \pm desvio padrão considerando significativamente diferentes para um $p < 0,05$. Os gráficos foram preparados e analisados usando o *software* GraphPad, usando ANOVA two-way.

RESULTADOS

Todos os animais, machos e fêmeas, desenvolveram artrite. Os escores clínicos no décimo dia após o início da doença foram de $11 \pm 2,9$ nas fêmeas e $11,16 \pm 4,02$ nos machos, sem diferença significativa (figura 1a).

Também não foram observadas diferenças na progressão global do escore clínico entre machos e fêmeas. No entanto, quando as patas dianteiras e traseiras foram avaliadas separadamente, foi encontrada diferença significativa na progressão da artrite nas patas traseiras, sendo que no quinto dia de avaliação os machos apresentavam maiores escores nessas patas do que as fêmeas (machos $5,8 \pm 1,1$; fêmeas $3,1 \pm 1,8$ - $p < 0,05$) (figura 1b).

Simultaneamente ao escore clínico da artrite foi mensurado o edema das patas traseiras, como uma medida direta do grau de inflamação. Ao final do experimento os animais apresentaram níveis semelhantes de edema. Contudo, da mesma forma que o observado para o escore de artrite, no 5º dia de doença o edema nas patas traseiras dos machos estava aproximadamente 18% maior em relação às fêmeas (machos $4,5 \pm 0,4$; fêmeas $3,8 \pm 0,5$ - $p < 0,05$). (figura 2), indicando uma progressão mais rápida da doença.

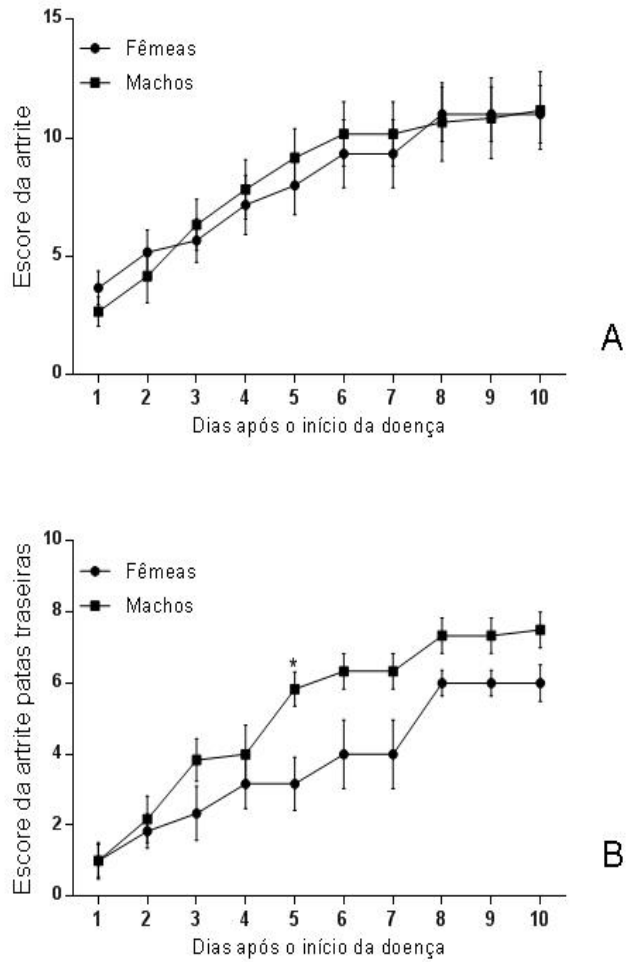


Figura 1: (A) Escore clínico global da artrite nos 10 dias após início da artrite clínica; (B) Escore clínico das patas traseiras nos 10 dias experimentais; (média, barras indicam erro padrão, ● fêmeas - ■ machos) * $p < 0,05$.

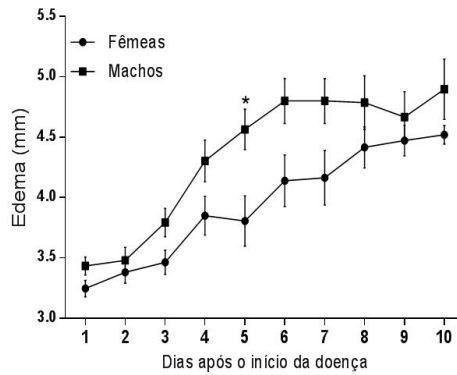


Figura 2: Edema das patas traseiras no decorrer de 10 dias. (média, barras indicam erro padrão, ● fêmeas - ■ machos) * $p < 0,05$

RESULTADOS

Todos os animais, machos e fêmeas, desenvolveram artrite. Os escores clínicos no décimo dia após o início da doença foram de $11 \pm 2,9$ nas fêmeas e $11,16 \pm 4,02$ nos machos sem diferença significativa (figura 1a).

Também não foram observadas diferenças na progressão global do escore clínico entre machos e fêmeas. No entanto, quando as patas dianteiras e traseiras foram avaliadas separadamente, foi encontrada diferença significativa na progressão da artrite nas patas traseiras, sendo que no quinto dia de avaliação os machos apresentavam maiores escores nessas patas do que as fêmeas (machos $5,8 \pm 1,1$; fêmeas $3,1 \pm 1,8$ - $p < 0,05$) (figura 1b).

Simultaneamente ao escore clínico da artrite foi mensurado o edema das patas traseiras, como uma medida direta do grau de inflamação. Ao final do experimento os animais apresentaram níveis semelhantes de edema. Contudo, da mesma forma que o observado para o escore de artrite, no 5º dia de doença o edema nas patas traseiras dos machos estava aproximadamente 18% maior em relação às fêmeas (machos $4,5 \pm 0,4$; fêmeas $3,8 \pm 0,5$ - $p < 0,05$). (figura 2), indicando uma progressão mais rápida da doença.

DISCUSSÃO

Poucos estudos avaliam as diferenças do desenvolvimento da CIA entre gêneros, mesmo assim, a maioria dos estudos opta por trabalhar com machos, limitando o aproveitamento das criações de animais experimentais. Neste estudo, tanto machos como fêmeas desenvolveram a doença, com parâmetros clínicos semelhantes ao final do período experimental (10 dias). Do ponto de vista de progressão da doença, também não houve diferença no escore global entre os sexos, apenas se observando uma tendência de desenvolvimento mais precoce ou mais intensa de artrite nas patas traseiras dos machos, por volta do quinto dia.

Na literatura somente dois estudos compararam o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em camundongos machos e fêmeas (12,13). Holmdahl et al. em 1985 utilizaram camundongos DBA/1 para avaliar a incidência da CIA usando colágeno tipo II heterólogo a autólogo (12). Ele observou o desenvolvimento da CIA exclusivamente em machos quando a imunização utilizava colágeno tipo II autólogo e uma incidência bastante aumentada em machos quando utilizado o colágeno tipo II heterólogo (rato, galinha e bovino).

Da mesma maneira, Courtenay também observou maior frequência de artrite em machos (13). Essas observações contrastam com os nossos achados, onde não observamos diferenças tão nítidas de desenvolvimento da artrite entre os sexos. Essas diferenças poderiam ser explicadas pela grande diferença do tempo de desenvolvimento da artrite entre os estudos. No estudo de Holmdahl, para desenvolver a artrite levou de 3 a 9 semanas depois do booster, enquanto no nosso experimento houve desenvolvimento bem mais rápido, com escores elevados ao final de somente 10 dias de doença (12). Apesar de basicamente ter sido empregado o mesmo protocolo de imunização e cepa de camundongos, as diferenças observadas podem ser decorrentes de variações nos reagentes utilizados para imunização, como o tipo de colágeno e de adjuvante produzidos atualmente (fonte, grau de pureza e concentração) e os disponíveis em 1985.

Um aspecto interessante é a observação de acometimento distinto da artrite das patas traseiras e dianteiras nos machos. Em seu estudo, Holmdahl não observou essa diferença nos camundongos DBA/1, mas observou uma preponderância da patologia nas patas traseiras em camundongos BIOG, enquanto camundongos NFWN desenvolviam artrite exclusivamente nessas patas (12). Usualmente nos estudos as avaliações clínicas e histológicas são realizadas nas patas traseiras. A observação de maior intensidade de artrite nas patas traseiras pode ser atribuída ao fato de os animais se apoiarem mais sobre os membros inferiores ao se erguerem, agravando o dano articular provocado pelo processo inflamatório. Esse efeito seria ainda mais importante nos machos, por serem mais pesados. Podemos ainda hipotetizar que a não observação dessa diferença nos modelos de CIA em DBA/1, que sugere efetiva diferença na gravidade e severidade da doença entre os modelos atuais e os de quase três décadas atrás (12).

A modulação hormonal no desenvolvimento da artrite experimental já foi bem demonstrada em diversos estudos (14,15). Em camundongos DBA machos, pesquisadores avaliaram o tratamento oral com etinilestradiol, um hormônio estrógeno usado em pílulas anticoncepcionais, e observaram uma supressão clínica e histológica da doença quando comparada com os controles (16). Outro estudo utilizou o antagonista do receptor de estrogênio ICI 182,780 em camundongos DBA fêmeas com e observaram uma piora no quadro da doença (17).

Em 1986 Holmdahl também observou que camundongos fêmeas ooforectomizadas eram igualmente suscetíveis ao desenvolvimento da CIA quanto camundongos machos normais e a severidade da doença foi maior comparada aos seus controles, indicando um papel protetor dos hormônios sexuais femininos (6).

Também em humanos, pesquisas apostam no papel dos hormônios para justificar o viés sexual na AR (6,18,19). Diferenças entre homens e mulheres na AR são bastante conhecidas. Tanto a prevalência quanto a incidência da doença diferem entre os sexos. Em mulheres a incidência aumenta constantemente a partir da puberdade e atinge seu máximo na menopausa e em idades mais avançadas. AAR é incomum em homens antes dos 45 anos de idade, a partir da qual a incidência da doença aumenta substancialmente e se aproxima dos valores femininos na idade igual ou maior que 70 anos (20). Quanto à gravidade da doença, há discussão se ela é maior em homens do que em mulheres (21).

Apesar de ainda pobremente compreendido, o papel dos hormônios sexuais como imunomoduladores

já tem sido bem documentado (6,7,18). No nosso experimento, entretanto, observamos que utilizando cepas de camundongos DBA/1 e os reagentes disponíveis comercialmente, essa influência parece não ser suficiente para alterar a história natural da doença, que parece ser mais grave e acelerada do que os modelos históricos. Portanto, podemos inferir que experimentos que pretendam avaliar o comprometimento articular ou muscular destes animais poderão utilizar ambos os sexos, com o cuidado de aguardar o desenvolvimento mais avançado da doença para análise. Dessa forma, é possível obter um melhor aproveitamento das criações desses animais experimentais. Por fim, os achados neste estudo indicam que para estudos envolvendo a avaliação do escore histológico dos membros traseiros é preferencial o uso de camundongos machos, no entanto estudos que buscam o efeito sistêmico da artrite poderiam ser realizados com ambos os gêneros.

Conflito de interesses

Declaramos que não temos conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094-108.
2. Guidelines AcorSORA. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. 2002.
3. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2011;70(8):1357-62.
4. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2040-4.
5. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*. 2007;2(5):1269-75.
6. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M. Female sex-hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis and Rheumatism*. 1986;29(12):1501-9.
7. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clinical Immunology*. 2004;113(3):224-30.
8. Council NR. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
9. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2011;63(10):2956-65.
10. Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(1):65-73.
11. Matsumoto I, Zhang H, Yasukochi T, Iwanami K, Tanaka Y, Inoue A, et al. Therapeutic effects of antibodies to tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in mice with glucose-6-phosphate isomerase induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2008 10:R66.
12. Holmdahl R, Jansson L, Gullberg D, Rubin K, Forsberg PO, Klareskog L. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clinical and Experimental Immunology*. 1985;62(3).

13. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980;283(5748).
14. Wilder RL. Hormones and autoimmunity: Animal models of arthritis. *Baillieres Clinical Rheumatology*. 1996;10(2).
15. Waksman Y, Hod I, Friedman A. Therapeutic effects of estradiol benzoate on development of collagen-induced arthritis (CIA) in the Lewis rat are mediated via suppression of the humoral response against denatured collagen type II (CII). *Clinical and Experimental Immunology*. 1996;103(3).
16. Subramanian S, Tovey M, Afentoulis M, Krogstad A, Vandebark AA, Offner H. Ethinyl estradiol treats collagen-induced arthritis in DBA/1LacJ mice by inhibiting the production of TNF-alpha and IL-1 beta. *Clinical Immunology*. 2005;115(2):162-72.
17. Jansson L, Holmdahl R. Enhancement of collagen-induced arthritis in female mice by estrogen receptor blockage. *Arthritis and Rheumatism*. 2001;44(9):2168-75.
18. Cutolo M, Brizzolara R, Atzeni F, Capellino S, Straub RH, Puttini PCS. The immunomodulatory effects of estrogens Clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. *Neuroendocrine Immunology in Rheumatic Diseases: Translation from Basics to Clinics*. 2010;1193:36-42.
19. Taneja V, David CS. Role of HLA class II genes in susceptibility/resistance to inflammatory arthritis: studies with humanized mice. *Immunological Reviews*. 2010;233:62-78.
20. Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JAP, van Riel P. Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2001; 28(8):1809-16.
21. Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. *Arthritis Research & Therapy*. 2009;11(1).

Recebido: 23/11/2012

Aceito: 10/12/2012