

## La utilidad de un modelo in vivo estandarizado de artritis reumatoide para diferenciar entre agentes antiinflamatorios e inmunosupresores.

Mata Franco, José Manuel (1), Escobedo Martínez, Carolina (2).

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas | Dirección de correo electrónico: jm.matafranco@ugto.mx

2 Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: c.escobedo@ugto.mx

---

### Resumen

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antiartrítica de dos fármacos: La Fenilbutazona (antiinflamatorio no esteroideo) y Ciclofosfamida (inmunosupresor), el primero utilizado en casos de inflamación crónica en humanos, el segundo como parte de los tratamientos para diversos tipos de cáncer, inmunosupresor en trasplantes y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. La evaluación antiartrítica de estos fármacos fue probada sobre un modelo murino artrítico inducido con Adyuvante Completo de Freund. La Fenilbutazona se administró a la dosis de 80 mg/kg y la Ciclofosfamida a 10 mg/kg.

La administración oral de fenilbutazona en animales con artritis no establecida registró una actividad significativa de inhibición del edema formado dentro del periodo de la fase aguda a las 5 y 8 horas y para la fase crónica a partir del día 9 y hasta el término del experimento (día 30). La ciclofosfamida solo mostró inhibición del edema dentro de los días 15-19.

### Abstract

The main objective of this study was to evaluate the antiarthritic activity of two drugs: Phenylbutazone (non-steroidal anti-inflammatory) and Cyclophosphamide (immunosuppressant), the first used in cases of chronic inflammation in humans, the second as part of treatments for various types of cancer, immunosuppressant in transplants and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. The antiarthritic evaluation of these drugs was tested on an arthritic murine model induced with Freund's Complete Adjuvant. Phenylbutazone was administered at the dose of 80 mg / kg and Cyclophosphamide at 10 mg / kg.

Oral administration of phenylbutazone in animals with non-established arthritis registered a significant edema inhibition activity formed within the period of the acute phase at 5 and 8 hours and for the chronic phase from day 9 and until the end of the experiment (day 30). Cyclophosphamide only showed inhibition of edema within 15-19 days.

## Introducción

La artritis reumatoide, poliartritis inflamatoria más común del adulto, que afecta cerca del 1 % de la población mundial, predomina más en mujeres que en hombres, se presenta con mayor frecuencia entre los 30 y 50 años, y conlleva a una gran discapacidad del paciente. Se caracteriza por una sinovitis erosiva simétrica, en la cual el tejido conjuntivo proliferativo (pannus), invade y erosiona el cartílago y el hueso de las articulaciones [1]. Se utilizan analgésicos y antiinflamatorios, incluyendo los esteroides, para suprimir los síntomas. Se han propuesto nuevas terapias, como las dirigidas al factor de necrosis tumoral alfa (infliximab) o la terapia anti-CD20 (rituximab), que inhibe el proceso inmunológico subyacente. Sin embargo, todos estos fármacos tienen varios efectos no deseados. Investigaciones recientes buscan descubrir fármacos antiinflamatorios de acción prolongada con mínimos efectos secundarios [2]. Modelos animales han sido extensamente usados en estudios de patogénesis de artritis reumatoide. A pesar de las inherentes limitaciones de todos los modelos animales, numerosos modelos de roedores han hecho progresar significativamente nuestro entendimiento en lo fundamental acerca de los mecanismos cruciales de la artritis reumatoide y contribuido en el avance actual del tratamiento [3]. La Fenilbutazona fue introducida en la medicina humana en 1949 como un agente novedoso, siendo una droga tipo antiinflamatorio no esteroideo (AINE) para uso en el tratamiento de dolor inflamatorio agudo y crónico, en particular diversas formas de artritis (Von Rechenberg, 1962). Probó ser un excelente analgésico y, por 30 años ha sido extensamente utilizado, por ejemplo, como la droga de elección para el tratamiento de artritis [4]. El uso de drogas inmunosupresoras para el tratamiento de la artritis reumatoide ha sido defendido por décadas. La ciclofosfamida es un agente antineoplásico ampliamente usado en el tratamiento de pacientes con cáncer. Es una droga alquilante, con un efecto citotóxico marcado en células mononucleares y otros leucocitos. Esos efectos resultan en la supresión de las respuestas inmunes que se cree, están involucradas en la patogénesis de la artritis reumatoide [5].

## Materiales y métodos

### Fármacos

Las sustancias empleadas fueron: Adyuvante completo de Freund, Fenilbutazona y Ciclofosfamida (Sigma Aldrich).

### Vehículo

Para realizar la administración de los compuestos (Ciclofosfamida y Fenilbutazona), fue empleado como vehículo aceite de maíz (0.1ml/100g), y DMSO al 5% en referencia al volumen total del aceite para cada dosis correspondiente.

### Animales

Los experimentos efectuados fueron hechos conforme a los estándares éticos para la investigación experimental del dolor en animales que marca la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron ratas macho Wistar consanguíneas (173-235.5 g), éstas fueron obtenidas del Biotorio de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. Los animales se alojaron en 5 grupos, conteniendo 3 ratas/grupo: Vehículo, Fenilbutazona A (Artritis no establecida), Fenilbutazona B (Artritis establecida), Ciclofosfamida A (Artritis no establecida), Ciclofosfamida B (Artritis establecida). Al término del experimento (30 días), todos los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico.

### Actividad anti-inflamatoria

El estado de artritis fue inducido mediante una inyección intradérmica plantar (con el empleo de una aguja calibre 20) en la pata trasera derecha de cada animal con un volumen de 0,05 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich).

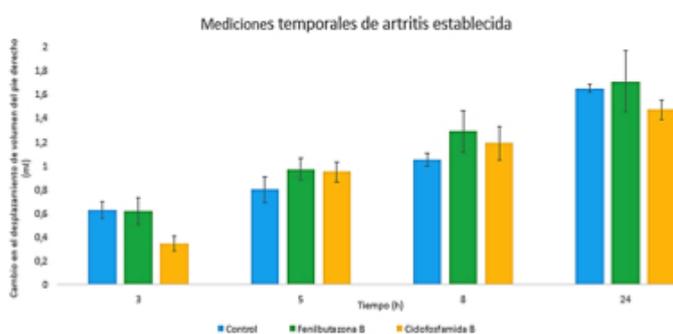
La presente metodología, descrita por Newbould (1963) [6], ha sido extensamente utilizada para detectar fármacos antiinflamatorios con posible actividad antiartrítica. Elegido de entre múltiples tipos de adyuvantes disponibles, el adyuvante completo de Freund (CFA) es el que más comúnmente se emplea en la experimentación con animales, su contenido consiste en micobacterias muertas (generalmente *Mycobacterium bovis* BCG) con una concentración  $\geq$  1mg/ml.

El avance del edema inducido fue valorado mediante el método de desplazamiento volu-

métrico, bajo el empleo de un pletismómetro digital PAN LAB. El desplazamiento del volumen fue valorado a las 3, 5, 8 y 24 horas posterior a la inyección con CFA. Con el fin de evaluar la actividad en la inducción de la artritis, el avance del volumen de la pata de cada animal fue registrado diariamente por 30 días. En el caso de los grupos de artritis no establecida la Ciclofosfamida (10 mg/kg) y la Fenilbutazona (80 mg/kg) fueron administradas vía oral previo una hora a la inyección de CFA y diariamente hasta el día 14. En el caso de los grupos de artritis establecida la administración de Ciclofosfamida (10 mg/kg) y la Fenilbutazona (80 mg/kg) se realizó a partir del día 17 hasta el día 30, previo la inyección de CFA desde el día 1, teniendo en ambos casos 14 días de tratamiento, y un previo ayuno de 1 h. Adicionalmente, se observó la aparición y avance de lesiones secundarias en las patas no inyectadas, orejas o cola de los animales de ensayo. Las desigualdades entre los grupos de fármacos y el vehículo fueron estadísticamente analizadas mediante la prueba estadística de Tukey en el software GraphPad Prism 7.

## Resultados y discusión

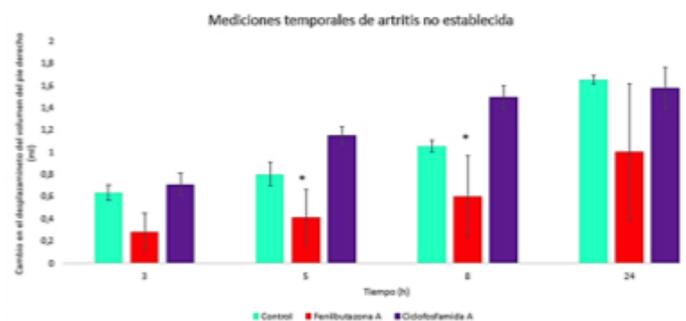
El efecto observado en la artritis establecida (Fenilbutazona B y Ciclofosfamida B) en las ratas en las primeras horas post-inducción de la inflamación, empleando el adyuvante completo de Freund, nos indicó que a las 3 horas hay una



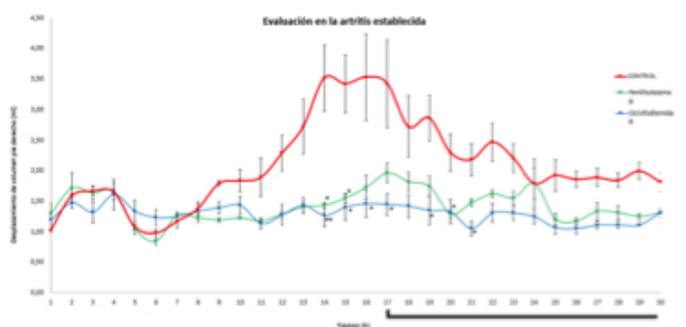
**IMAGEN 1:** Artritis establecida (administración del fármaco del día 17 al 30). Efecto de inhibición del edema posterior a la administración (p.o.) de fenilbutazona (80 mg / kg) y ciclofosfamida (10mg/kg) en ratas wistar machos durante la fase aguda (3, 5, 8 y 24 horas). Cada punto en el curso del tiempo muestra la media de tres mediciones. Los datos se analizaron mediante la prueba de Tukey.

pequeña inhibición del edema en la ciclofosfamida (Imagen 1), y en las horas posteriores se observa una tendencia muy similar de el volumen del edema en los tres grupos pero en ningún caso son resultados significativos de inhibición del edema para la fase aguda.

Respecto a la artritis no establecida (Fenilbutazona A y Ciclofosfamida A), en las 3 horas posteriores a la inducción de la inflamación se muestra una marcada inhibición del edema por parte de la Fenilbutazona, pero no es hasta las horas 5 y 8 donde se registra un efecto de inhibición del edema estadísticamente significativo respecto a los dos grupos adicionales evaluados (Imagen 2), caso contrario de la Ciclofosfamida, que en ningún momento de la fase aguda mostró un efecto significativo de inhibición del edema.



**IMAGEN 2:** Artritis no establecida (administración del fármaco del día 1 al 14). Efecto de inhibición del edema posterior a la administración (p.o.) de fenilbutazona (80 mg / kg) y ciclofosfamida (10mg/kg) en ratas wistar machos durante la fase aguda (3, 5, 8 y 24 horas). Cada punto en el curso del tiempo muestra la media de tres mediciones. Los datos se analizaron mediante la prueba de Tukey.



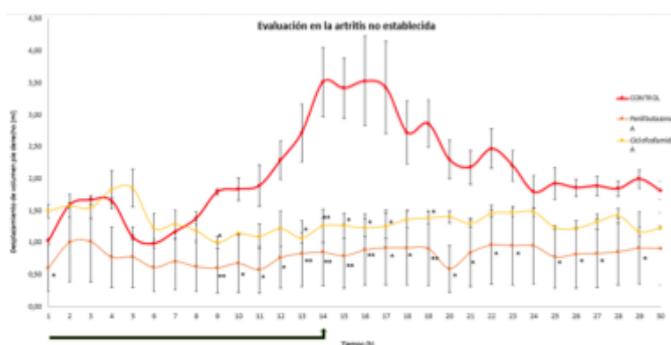
**IMAGEN 3:** Artritis establecida (administración del fármaco del día 17 al 30). Efecto de inhibición del edema posterior a la administración (p.o.) de fenilbutazona (80 mg / kg) y ciclofosfamida (10 mg / kg) en ratas wistar machos durante la fase crónica. Cada punto en el curso del tiempo muestra la media

de tres mediciones. Los datos se analizaron mediante la prueba de Tukey.

En lo que respecta a la fase crónica, de los grupos con la artritis establecida, la administración de Ciclofosfamida registró una inhibición de edema estadísticamente significativa los días 15, 16, 17, 19 y 21, siendo el tratamiento con esta droga el que presenta un comportamiento más favorable pues mantiene el desplazamiento del volumen por debajo ligeramente de la Fenilbutazona que sólo presentó tres puntos relevantes al día 14, 15 y 20 del experimento, lo cual es un poco confuso, pues no se administró medicamento hasta el día 17 para estos grupos de artritis establecida, se esperaba su comportamiento al inicio del experimento muy similar al control, más tomó una tendencia a no inflamarse.

La respuesta favorable ante el uso de la ciclofosfamida en la artritis establecida (Imagen 3) es comprensible, tomando en cuenta la conocida y empleada acción inmunosupresora que controla el nivel de inflamación ya establecido evitando un incremento de la respuesta inmune en la extremidad, dejando el nivel de desplazamiento en un área con poca variabilidad.

En la artritis no establecida (administración de ambos fármacos del día 1 al 14), en la fase crónica, se puede observar que el fármaco Fenilbutazona muestra una inhibición del edema estadísticamente significativo para los días 9-23, 25, 26, 27 y 29 (Imagen 4). Siempre manteniendo un nivel de inflamación bajo y favorable relativo al control y a la Ciclofosfamida. En el caso de la ciclofosfamida, ésta presentó una tendencia muy similar a la de la fenilbutazona, registrándose una inhibición del edema estadísticamente significativa los días 9, 13-17 y 19.



**IMAGEN 4:** Artritis no establecida (administración del fármaco del día 1 al 14). Efecto de la administra-

ción (p.o.) de fenilbutazona (80 mg / kg) y ciclofosfamida (10 mg / kg) en ratas en la artritis no establecida crónica (30 días), induciendo con CFA la fase de inflamación en la pata trasera del mudo (rata.). Cada punto en el curso del tiempo muestra la media de tres mediciones. Los datos se analizaron mediante la prueba de Tukey.

Ambos medicamentos mostraron una acción eficaz desde los primeros días, e inclusive más allá del cese de su administración, manteniendo esta tendencia hasta finalizado el experimento. La Fenilbutazona debido a su toxicidad no se emplea como analgésico o antipirético general. Es efectiva en la mayoría de los trastornos músculo esqueléticos (espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis reumatoide, gota), pero sólo debe usarse en aquellos trastornos reumáticos agudos que no han respondido a otras terapias con drogas menos tóxicas [7].

La Ciclofosfamida es un potente inmunosupresor que puede disminuir la respuesta inmune bloqueando la producción de DNA en las células, es utilizada para severas complicaciones de lupus, esclerosis sistémica, algunas formas de vasculitis, miopatías, así como polimiositis y dermatomiositis; y algunas veces para artritis reumatoide [8].

Es relevante mencionar que en el experimento solo se utilizaron ratas macho, la razón es que existen estudios que aseguran la interferencia de los ciclos hormonales de las hembras y así los efectos que pueden ocasionar en los resultados, de aquí que el género influye en la prevalencia, curso y la gravedad de las enfermedades [9].

## Conclusión

Dentro de la fase aguda (artritis no establecida), la fenilbutazona mostró un efecto significativo de inhibición del crecimiento del edema a las 5 y 8 horas.

En la fase crónica (artritis no establecida), la fenilbutazona tuvo un efecto significativo de inhibición del edema a partir del día 9 y prácticamente hasta el término del experimento (día 30). En el caso particular de la administración de ciclofosfamida, sólo mostró un efecto significativo de inhibición del edema dentro del periodo 15-19 días.

Los resultados registrados para la fase crónica (Artritis establecida), no son muy contundentes, debido a que trabajamos con ratas de peso corporal mayor a 200 g, mismas que muestran

cierta resistencia al proceso de inflamación, sin embargo es posible observar en los resultados que la administración de la fenilbutazona controla en cierta manera mejor la formación del edema.

### Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica del C. Juan Pedro Galván Chía.

Agradecemos la contribución a la estudiante de la carrera de Q.F.B. Fátima del Carmen López González.

### Referencias

[1]. Miriam Noa Puig; Rosa Más Ferreiro; Sarahí Mendoza Castaño; Maikel Valle Clara. Fisiopatología, tratamiento y modelos experimentales de artritis reumatoide. Rev Cubana Farm. 2011 v.45 n.2

[2]. Sanmugapriya Ekambaram; Senthamil Selvan Perumal; Venkataraman Subramanian. Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2010. 10(1): p. 56.

[3]. Darren L. Asquith; Ashley M. Miller; Iain B. McInnes and Foo Y. Liew, Autoimmune disease: Rheumatoid arthritis Animal models of rheumatoid arthritis. Eur. J. Immunol. 2009. 39: 1991–2058.

[4]. Peter Lees; Pierre-Louis Toutain, Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, toxicology and residues of phenylbutazone in humans and horses. The Veterinary Journal 196 (2013) 294–303.

[5]. Suarez-Almazor ME; Belseck E; Shea B; Tugwell P; Wells GA, Cyclophosphamide for treating rheumatoid arthritis. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2010.

[6]. Newbould, B.B.; Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. Br. J. Pharmacol. 1963. 21: p. 127-136

[7]. Martindale, Guía completa de consulta farmacoterapéutica, 1a ed.(2003). The Merck Index, 13a ed. (2001). Monografías Farmacéuticas, C.O.F. de Alicante (1998). Formulario

médico farmacéutico, PharmaBooks, 2010.

[8]. American College of Rheumatology. (2019). Cyclophosphamide (cytoxan). 14 de Agosto de 2019, American College of Rheumatology. Sitio web: <https://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/Treatments/Cyclophosphamide-Cytoxan>.

[9]. Reyes Cisneros, Andrea, Escobedo Martínez, Carolina, Guzmán Gutiérrez, Silvia Laura, Deveze Álvarez, Martha Alicia, Enríquez Habib, Raúl Guillermo. Estandarización de fármacos antiinflamatorios no esteroideos administrados a un modelo múrido para evaluación de actividad antiartrítica, Jóvenes en la ciencia, revista de divulgación científica, 2018.