

## Modificaciones histoquímicas y vasculares en la fisis tibial de la rata inducidas por el enclavijamiento

G. GARCÉS MARTÍN\*, \*\*, E. GUERADO PARRA\*\* y J. RAMIREZ GONZÁLEZ\*

### RESUMEN

En la tibia derecha de 56 ratas macho de un mes se introdujo una aguja de 0'9 mm. de diámetro y 15 mm. de largo, atravesando la fisis proximal perpendicularmente. Fueron sacrificadas en grupos iguales al cabo de 2, 4, 8 y 12 semanas empleando diez animales para estudiar la presencia de proteoglicanos, mediante la tinción del azul alcian, y cuatro para estudio vascular.

Desde el principio, en la mayoría de animales se observó una disminución, y luego ausencia, en la captación del azul alrededor de la aguja con normal coloración del resto de la fisis comparada con la contralateral. Al cabo de dos semanas, en la epifisis y metáfisis se apreció un incremento de la vascularización en la zona de la aguja, sin llegar a invadir la fisis. Después de la octava semana varios vasos cruzaban la placa fisaria en la zona de inserción del cilindro metálico pero dejaban indemne el resto del cartílago de crecimiento.

Los hallazgos de este trabajo sugieren que las agujas tienen un efecto directo sobre los cartílagos fisarios como inductoras de osteogénesis.

Descriptores: Osteosíntesis. Cartílago de crecimiento. Rata.

### SUMMARY

A pin, 0'9 mm. in diameter and 15 mm. long, was inserted in the right tibia of 56 one month-old-male rats crossing the proximal growth plate. The animals were sacrificed at 2, 4, 8 and 12 weeks after operation. A histochemical, Alcian Blue staining, and microvascular study was carried out in the proximal growth plates of both tibias.

In most animals no Alcian Blue staining was observed on the growth plate around the pin from the beginning, but the remaining growth cartilage was normal as compared to the contralateral one. At the 2nd week vascular supply increased around the pin both in the epiphysis and the metaphysis but no vessels were observed to cross the growth plate. After the 8th week a few vessels crossed the physis where the pin was inserted but not in the remaining plate.

These findings suggest that pins inserted across growth plates induce bone formation in them.

Key words: Osteosynthesis. Growth Plate. Rat.

### Introducción

Existe una gran controversia acerca de los efectos que producen las agujas que atraviesan las placas de crecimiento. Mientras que para algunos autores las osteosíntesis no roscadas tienen un efecto nulo o mínimo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) para otros darían lugar a un enlentecimiento del crecimiento óseo (8, 9, 10, 11, 12). Recientemente ha sido reportado que el retardo en el crecimiento sólo se produce tras ser mantenidas las agujas durante un tiempo considerable (13).

Los estudios histológicos de los autores que se han ocupado de este problema fueron realizados en períodos muy aislados. CAMPBELL y cols. (3) observaron irregularidades del cartílago alrededor de

la aguja con interfase fibrosa y ocasional aparición de trabeculación, sin indicar el tiempo de aparición de estas modificaciones. SIFFERT (6) señaló la presencia de un tejido similar al endotelial y BAILEY y DUBOW (2) refirieron la existencia de fibrosis y trabeculación en algunos animales. Tampoco estos autores indicaron cuando aparecieron sus hallazgos. Únicamente GARCÉS y GUERADO (14) efectuaron un seguimiento evolutivo, comprobando la progresiva transformación del cartílago fisario alrededor de la aguja que dió lugar a un puente de epifisiodesis sin alteración del resto de la fisis.

Para intentar conocer algunos aspectos de los mecanismos que condicionan esta transformación, en este trabajo se estudian las modificaciones microvasculares e histoquímicas, referidas a la presencia de proteoglicanos sulfatados, que acontecen tras la inserción de agujas a través del cartílago fisario.

### Material y método

Se han utilizado cincuenta y seis ratas macho cepa Sprague-Dowley de un mes de edad, entre 70 y 85 gramos de peso. Tras ser anestesiadas con eter se realizó una incisión parapatelar externa en la rodilla derecha, rechazando el tendón rotuliano medialmente e introduciendo una aguja de 0.9 mm. de diámetro y 15 mm. de largo en la zona interespinal de la meseta tibial perpendicular al punto central del cartílago de crecimiento. Para evitar la emigración distal de la aguja se practicó una curvatura de 90° en su parte proximal. La piel se suturó tras comprobar que la aguja no interfería con el movimiento normal de la articulación por estar situada en la escotadura intercondilea. Una vez finalizada la operación los animales fueron devueltos a su entorno natural permitiéndoseles comer y beber ad libitum.

Tras ser divididos en cuatro grupos de catorce elementos se sacrificaron al cabo de dos, cuatro, ocho y doce semanas de realizada la operación. De cada grupo diez fueron utilizados para estudio histoquímico y cuatro para estudio microvascular. Para el estudio histoquímico, una vez sacrificados los animales, se extrajeron ambas tibias, eliminando la aguja y las



FIG. 1.— Radiografía del miembro posterior de la rata tras enclavamiento.

partes blandas. El tercio superior de las mismas fue fijado en líquido de Bouin durante 24 horas, decalcificado en solución de Schmorl, deshidratado e incluido en parafina según técnica habitual. Tras cortes de 7 micras se tiñeron con la técnica del Azul Alcian de STEEDMAN y LISON (15) para observar en azul los mucopolisacáridos ácidos. El estudio de la vascularización se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita previamente por GARCÉS y GARCÍA CASTELLANO (16).

## Resultados

### Histoquímica

Al cabo de la segunda semana de comenzada la experiencia, en las extremidades enclavadas pudo observarse un doble patrón histoquímico: en la mayoría de especímenes la zona alrededor de la aguja no captaba el colorante azul salvo en zonas aisladas de la capa hipertrofica. La matriz de esta zona mostraba fenó-

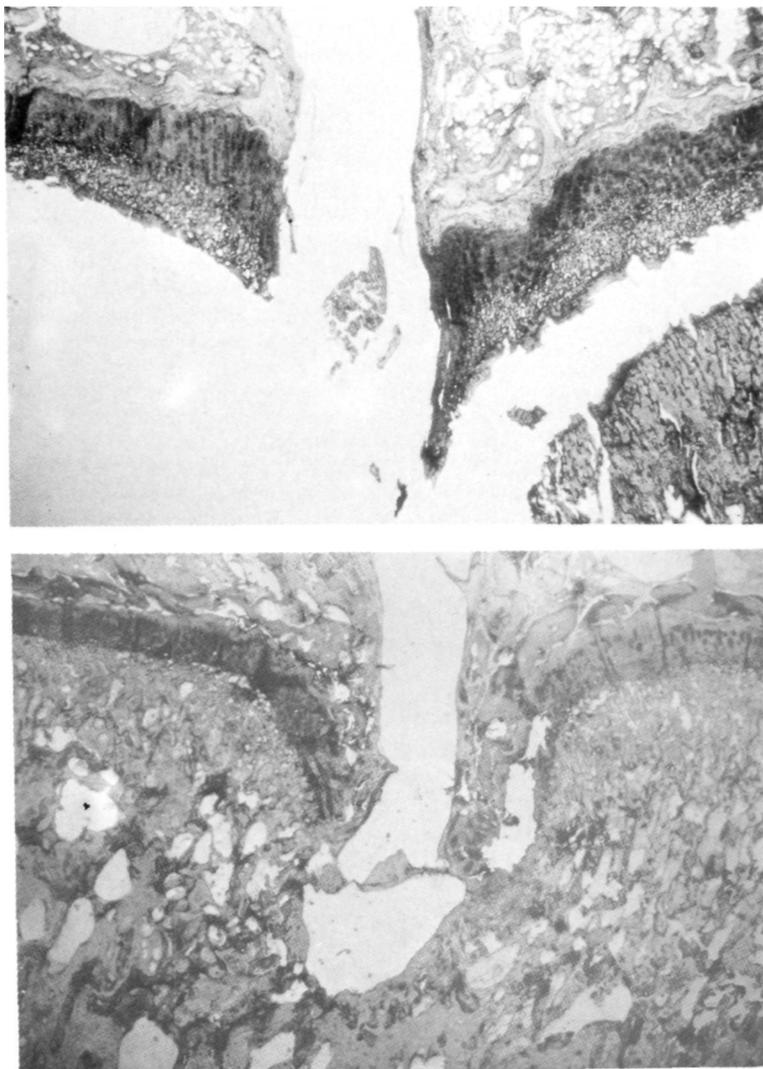


FIG. 2.— Dos aspectos distintos de la fisis tras dos semanas de enclavamiento. En A) la captación del nuevo azul es completa y no hay formación ósea, 25X. En B) la zona adyacente al hueco no capta el azul y demuestra formación de trabeculación ósea. 63X. Azul Alcian.

menos degenerativos con muchas partes en las que incluso el rojo neutro utilizado como mordiente no era captado (fig. 2 A). Estas partes evidenciaban la misma coloración que el hueso epi y metafisario. El resto de la placa mostraba la normal positividad al azul para la edad de los animales. En el resto de los animales, donde el cartilago adyacente a la aguja aparecía sin alteraciones, toda la placa mostraba un intenso color azul indicando la positividad de la presencia de proteoglicanos sulfatados (fig. 2 B).

A las cuatro semanas la placa fue perdiendo positividad al azul alcian en las tibias derechas, como corresponde a la involución fisiológica propia de la edad. De este modo persistía la coloración azul a nivel de la matriz cartilaginosa en el tercio epifisario de la capa proli-

ferativa y en casi toda la capa hipertrófica. En esta era especialmente evidente la intensa coloración mostrada por el anillo perilacunar. Por el contrario, la capa germinal y los dos tercios restantes de la proliferativa presentaban un color rojo que identificaba la ausencia de mucopolisacáridos ácidos. En la zona fisaria adyacente al sitio ocupado por la aguja se apreciaba una estrecha franja que no tomaba el colorante azul pero si el rojo. La zona en más íntimo contacto con la aguja no se teñía y mostraba su osificación, uniéndose sin solución de continuidad al hueso epi y metafisario.

Después de ocho semanas las fisas enclavadas habían perdido, casi en su total extensión, la capacidad de captar el azul alcian. Únicamente la capa hipertrófica seguía tiñéndose con este color a nivel de sus núcleos y especialmente el anillo perilacunar de sus componentes. Seguían observándose, no obstante, algunas áreas aisladas positivas. Alrededor de la inserción de la aguja, la coloración roja no mostraba diferencias con el resto de la fisis y sólaente la estrecha franja adyacente, correspondiente al puente óseo, no se teñía, demostrando la ausencia de cartilago.

A las doce semanas, el color rojo existente prácticamente en toda la extensión de la placa demostraba la degeneración fisiológica que acontece a esta edad en la rata. Únicamente la malla de fibrina que ocupaba la periferia del hueco dejado por la aguja, mostraba una débil coloración azul. El puente óseo mostraba las mismas características de la etapa anterior.

Durante toda la experiencia la placa fisaria alejada de la aguja no mostró diferencias con la de las tibias controles.

#### Microvascularización

Al cabo de dos semanas pudo observarse la vascularización típica de los cartilagos fisarios, formada por tres sistemas principales: el sistema epifisario, con pequeñas arterias que forman un entremado vascular que envía arteriolas hacia la parte superior de la fisis y sin llegar a atravesarla se reflejan nuevamente hacia la epifisis a nivel de la capa de células de reserva; el sistema metafisario, formado por la división cada vez más arborizada de las dos ramas de la arteria nutricia hasta terminar en pequeños capilares que oradan la capa degenerada de la fisis, sin atravesarla tampoco; por último el sistema pericondral, que proviene de los vasos que rodean al cartilago de crecimiento y, tras una corta excursión paralela a éste, se dirigen perpendicularmente hacia el confun-

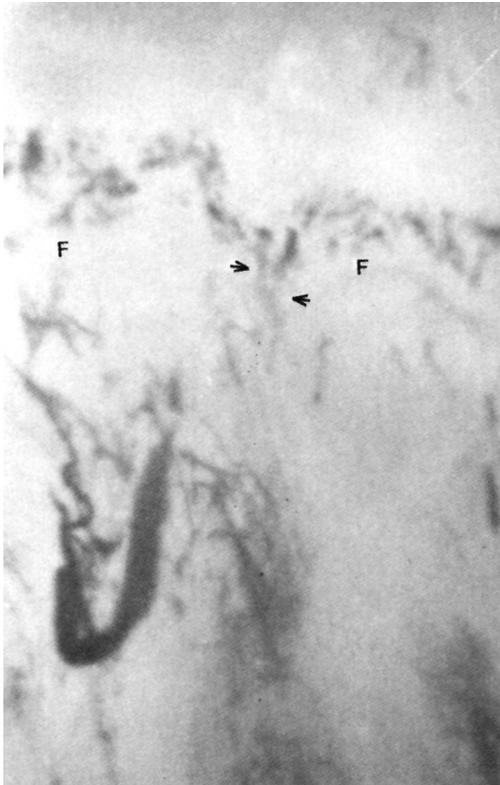


FIG. 3.— Corte en el que se demuestra la microvascularización epi y metafisaria tras doce semanas del enclavamiento. La zona central se aprecia atravesada por vasos que unen ambos sistemas vasculares (flechas) mientras que el resto de la fisis (F) permanece indemne a esta invasión. Método de Spalteholz, 12X.

diéndose con las ramas del sistema metafisario.

Esta estructuración, que se corresponde con la de cualquier otra zona fisaria, sólo se veía alterada a nivel de la inserción metálica, donde podía apreciarse un marcado aumento de la vascularización alrededor de la misma, tanto en la epifisis como en la metafisis. Conservaban, no obstante, el «respeto» por la fisis y no llegaban a contactar ambos sistemas.

A partir de la cuarta semana los patrones vasculares se mantenían sin cambios y, aunque continuaba el marcado aumento alrededor del área que había ocupado la aguja, no fue hasta la semana octava cuando pudo apreciarse diferencias: a este nivel, numerosos vasos del sistema epifisario atravesaban la fisis y se ponían en contacto con sus congéneres metafisarios. Este «puente» vascular contrastaba con la ausencia de estas estructuras que mostraba el resto de la placa fisaria, indicando que la invasión se había producido exclusivamente en el área dañada por la aguja.

### Discusión

Como ha sido comprobado anteriormente, la inserción de agujas no roscadas a través de los cartílagos de crecimiento da lugar a la aparición de puentes óseos alrededor de las mismas (2, 3, 14). Algunos autores que observaron esta neoformación ósea la consideraron fruto de la reparación de la microfractura producida por la inserción del material (2, 3). Sus estudios se realizaron en períodos aislados, sin seguimiento evolutivo. GARCÉS y GUERADO (14) comprobamos que el cambio inicial era una degeneración de la placa fisaria alrededor de la aguja y no una invasión del hueso epifisario. Esta zona se osificó progresivamente hasta presentar el aspecto observado por los autores mencionados. La simple observación histológica realizada en este trabajo dejaba muchas dudas por resolver.

Las modificaciones histoquímicas estudiadas en este actual trabajo representan una interesante aportación. La observación de algún espécimen en el que no se produjeron cambios en la captación del

azul alcian después de las dos primeras semanas, coincidiendo con la no aparición de hueso, obliga a pensar en una relación muy directa entre ambos elementos. Efectivamente, la presencia de proteoglicanos de larga cadena, típicos de la capa proliferativa, inhibe la calcificación-osificación en ese área (17, 18, 19).

Por el contrario, en aquellos animales en los que se apreció desde el principio la aparición de tejido óseo alrededor del hueco dejado por la aguja, era evidente un área más o menos amplia, adyacente a la anterior, en la que la ausencia de colorante azul demostraba a su vez la de proteoglicanos sulfatados. La normalidad en el resto de la fisis, en cuanto a captación del colorante, evidencia que nuestro hallazgo está condicionado por la inserción del metal.

La disminución de la síntesis de proteoglicanos puede tener varias explicaciones. El exceso de presión al que están sometidas las células adyacentes al metal, que no pueden adaptarse al mismo, podría condicionar este hallazgo. ERLICH y cols. (20) comprobaron que la presión ejercida por grapas sobre las placas fisarias frenó la actividad proliferativa de los condrocitos pero no alteró la captación de sulfatos marcados con  $S_{35}$ . Esto demostraba que la síntesis de proteoglicanos no se veía alterada por la compresión sostenida en la fisis. Más recientemente VAN KAMPER y cols. (21) demostraron que la compresión intermitente dió lugar a un aumento de la síntesis de estas estructuras *in vitro*. De este modo, la presión de la aguja no puede ser sugerida como la responsable de los cambios histoquímicos en nuestros animales.

Ha sido demostrado que la falta de movimiento y carga da lugar a una disminución en la producción de proteoglicanos del cartílago articular (22, 23, 24, 25). Siguiendo esta comprobación podría argumentarse que la inmovilización pro-

vocada por el dolor tras la inserción de la osteosíntesis condicionaría nuestros hallazgos. Sin embargo, si bien es cierto que nuestros animales mantenían relativamente inmóvil el miembro operado durante los dos primeros días, a partir del tercer día el movimiento en las dos extremidades fue exactamente igual. En este sentido, GARCÉS y GARCÍA CASTELLANO (16) observaron que después de mantener inmovilizada una extremidad posterior en ratas jóvenes, el cartílago epifisario femoral superior sufría una disminución en la captación del azul alcian. Sin embargo, GARCÉS y RAMÍREZ (26) comprobaron que no sucedía lo mismo con el cartílago de crecimiento tibial. Este, desde la primera semana de inmovilización, mostraba una ligera mayor apetencia por el colorante que el de la extremidad libre, siendo esta diferencia más acentuada al cabo de cuatro semanas.

Incluso con no aceptar lo anteriormente expuesto difícilmente podría explicarse por la inmovilización la diferente captación del azul alcian entre el área alrededor de la aguja y el resto de la placa, zonas sometidas por igual al movimiento del hueso.

La posibilidad de alteraciones en la síntesis de proteoglicanos mediatizadas por fenómenos electroquímicos en nuestros animales, representa una interesante sugerencia. BRIGHTON y cols. (27) demostraron que la síntesis de estos compuestos por parte de los condrocitos varía dependiendo de diversas corrientes eléctricas. Aunque no pasa de ser mera especulación, los pequeños cambios electroquímicos producidos alrededor de la aguja pueden haber causado las modificaciones histoquímicas observadas en nuestro trabajo. Esta teoría puede soportarse en el reciente artículo de BRIGHTON y HUNT (28), quienes encuentran que la colocación de electrodos en la cavidad medular de tibia de conejos induce la formación

ósea independientemente de que se use corriente o no.

El aumento de entramado vascular epi y metafisario observado desde el principio de nuestra experiencia, puede justificarse por el trauma local que supone la introducción de la aguja. Lógicamente esto conlleva un fenómeno reparador que es responsable del hallazgo antes mencionado. La falta de comprobación de vasos atravesando la fisis en la zona traumatizada al cabo de dos semanas soporta nuestra teoría de que la transformación observada en el cartílago fisario alrededor de la aguja no fue fruto del traumatismo sino inducida por la propia aguja (14). La abundancia de vasos en dicha zona al final de la experiencia demuestra la enorme actividad que ha tenido lugar alrededor del metal y la solidez de la estructuración ósea que puentea la epifisis y la metáfisis.

Teniendo en cuenta las consideraciones hechas hasta ahora, nuestra explicación a los fenómenos acaecidos tras la inserción de agujas a través de las placas fisarias es la siguiente:

Después de producirse el enclavamiento tiene lugar un fenómeno inflamatorio con aumento de vascularización y demás factores que condicionan la respuesta ósea a nivel trabecular epi y metafisario. En la fisis, a través de un mecanismo de compresión local y fenómenos electroquímicos, alrededor de la aguja se producen cambios que conducen a una disminución de la división celular y de la síntesis de proteoglicanos. La zona afectada se calcificará y osificará posteriormente dando lugar a un puente de epifisiodesis.

Los mecanismos íntimos de esta transformación son desconocidos. La importante observación de BRIGHTON y HUNT (28) acerca de la ausencia de vesículas matriciales en los sitios de osificación tras la inserción de electrodos inactivos abre

un interesante campo de investigación. El papel jugado por los factores locales, recientemente descubiertos, que controlan el crecimiento óseo (29), entra hoy por hoy en el terreno de la especulación. Creemos, no obstante, que es a estos niveles bioquímicos donde hay que buscar la respuesta a nuestros planteamientos.

La temprana aparición de modificaciones en el cartílago fisario alrededor de la aguja seguida por la progresiva osificación del mismo, sugieren desechar la idea de la inocuidad de las pequeñas osteosíntesis que cruzan la fisis. Sus efectos sobre estas no sólo son debidos a la cantidad de cartílago eliminado sino también a su inducción osteogénica.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BAILEY, R. and DUBOW, H.: Studies of longitudinal bone growth resulting in a extensible nail. *Surg. Forum* 14: 455-457, 1963.
2. BAILEY, R. and DUBOW, H.: Evolution of the concept of an extensible nail accommodating to normal longitudinal bone growth. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 159: 157-170, 1981.
3. CAMPBELL, C.; GRISOLIA, A. and ZANCONATO, G.: The effects produced in the cartilaginous epiphyseal plate of immature dogs by experimental surgical traumata. *J. Bone Joint Surg.* 41-A: 1.221-1.242, 1959.
4. CAÑADELL, J.: Lesiones del cartílago de crecimiento. Eunsa. Pamplona, 1976.
5. POUS, J.; DIMEGLIO, A.; BALDET, P. et BONNEL, F.: Cartilage de conjugaison et croissance. Doin Edit. Paris, 1980.
6. SIFFERT, R.: The effect of staples and longitudinal wires on epiphyseal growth. *J. Bone Joint Surg.* 38-A: 1.077-1.088, 1956.
7. SPEED, J. and MACEY, J.: Fractures of the humeral condyles in children. *J. Bone Joint Surg.* 15: 903-919, 1933.
8. BJERKREIM, I. and LANGARD, O.: Effect upon longitudinal growth of femur by intramedullary nailing in rats. *Acta Orthop. Scand.* 54: 363-365, 1983.
9. FORD, L. and KEY, A.: A study of experimental trauma to the distal femoral epiphysis in rabbits. *J. Bone Joint Surg.* 38-A: 84-92, 1956.
10. HAAS, S.: The changes produced in the growing bone after injury to the epiphyseal cartilage plate. *J. Orthop. Surg.* 15: 67-99, 1919.
11. HAAS, S.: Retardation of bone growth by a wire loop. *J. Bone Joint Surg.* 27: 25-36, 1945.
12. HAAS, S.: Restriction of bone growth by pins through the epiphyseal cartilaginous plate. *J. Bone Joint Surg.* 32-A: 338-343, 1950.
13. GARCÉS, G. y GUERADO, E.: Evolución longitudinal de la tibia de ratas tras enclavijamiento de la fisis proximal. Rev. SATO en prensa.
14. GARCÉS, G. y GUERADO, E.: Estudio histológico de la fisis tibial de la rata tras enclavijamiento. Datos no publicados.
15. DRURY, R. and WALLINGTON, E.: Carleton's Histological technique. Oxford Univ. Press, 5th Ed., Oxford, pp. 246-247, 1980.
16. GARCÉS, G. y GARCÍA CASTELLANO, J.: Efectos de la inmovilización prolongada sobre la cadera de la rata en crecimiento. *Rev. Esp. Cir. Ost.* 21: 161-169, 1986.
17. BLUMENTHAL, N.; POSNER, A.; SILVERMAN, L.; ROSENBERG, L.: Effect of proteoglycans on in vitro hydroxyapatite formation. *Calcif. Tiss. Int.* 27: 75-82, 1979.
18. BUCKWALTER, J. and ROSENBERG, L.: Proteoglycan aggregate structure in mineralizing cartilage. *Orthop. Trans.* 6: 38, 1981.
19. CHEN, C.; BOSKEY, A.; ROSENBERG, L.: The inhibitory effect of cartilage proteoglycans on hydroxiapatite growth. *Calcif. Tiss. Int.* 36: 285-290, 1984.
20. ERLICH, M.; MANKIN, H. and TREADWELL, B.: Biochemical and physiological events during closure of the stapled distal femoral epiphyseal plate in rats. *J. Bone Joint Surg.* 54-A: 309-322, 1972.
21. VAN KAMPEN, G.; VELDHIJZEN, J.; KUIJER, R.; van STADT, R.; SCHIPPER, C.: Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte cultures. *Arthrit. Rheum.* 28: 419-424, 1985.
22. ERONEN, I.; VIDEMAN, T.; FRIMAN, C. and MICHELSON, J.: Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis caused by immobilization. *Acta Orthop. Scand.* 49: 329-334, 1978.
23. VIDEMAN, T.; BRONEN, I. and FRIMAN, C.: Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthritis caused by immobilization. *Acta Orthop. Scand.* 52: 11-21, 1981.
24. VIDEMAN, T. und VANHARANTA, H.: Die Behandlung der experimentellen Arthrose mit Glykosaminoglykanpolysulfat. *Z. Rheumatol.* 42: 210-212, 1983.
25. PALMOSKI, M.; PERRICONE, E.; BRANDT, K.: Development and reversal of a pro-

- teoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthrit Rheum.* 22: 508-517, 1979.
- GARCÉS, G. y RAMÍREZ, J.: Efectos de la inmovilización en posición funcional sobre los cartílagos de crecimiento tibiales: estudio histológico e histoquímico. *Rev. Orthop. Traum.* en prensa.
- BRIGHTON, C.; UNGER, A. and STAMBOUGH, J.: In vitro growth of bovine articular cartilage chondrocytes in various capacitively coupled electrical fields. *J. Orthop. Res.* 2: 15-22, 1984.
28. BRIGHTON, C. and HUNT, R.: Ultrastructure of electrically induced osteogenesis in the rabbit medullary canal. *J. Orthop. Res.* 4: 27-36, 1986.
29. CENTRELLA, M. and CANALIS, E.: Local regulators of skeletal growth: A perspective. *Endocrine Reviews* 6: 544-551, 1985.