

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PATOLOGÍA DEL APARATO LOCOMOTOR.
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA. COLEGIO UNIVERSITARIO DE LAS PALMAS.

SERVICIO DE TRAUMATOLOGÍA Y CIRUGÍA ORTOPÉDICA.
HOSPITAL INSULAR DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Modificaciones histoquímicas de la fisis proximal tibial de ratas sometidas a stress emocional crónico

G. GARCÉS MARTÍN, F. JIMÉNEZ DIAZ y J. A. RAMIREZ GONZÁLEZ

RESUMEN

Se realiza un trabajo experimental con 50 ratas machos de un mes de edad, la mitad de las cuales se somete a stress crónico mediante restricción de su espacio vital. Tras ser sacrificadas al cabo de 1, 2, 4, 8 y 12 semanas se estudió la presencia de proteoglicanos sulfatados en la fisis tibial proximal con la técnica del azul alcian.

Los resultados demuestran que desde la primera semana las ratas stressadas presentaron una escasa apetencia por el colorante azul en casi toda la fisis, salvo en los núcleos de la capa hipertrófica. Esta característica se mantuvo durante toda la experiencia. Los animales controles mostraron una gran captación inicial que fue perdiéndose progresivamente hasta ser igual a la de los stressados al cabo de doce semanas.

Se sugiere que el stress da lugar a un frenado inicial en la actividad de los condrocitos proliferativos. Su actividad va recuperándose a medida que los animales se adaptan hasta llegar a normalizarse. El tiempo transcurrido de bajo rendimiento fisario aconseja evitar esta situación en niños con problemas ortopédicos o traumatológicos.

Descriptores: Stress. Cartilago de crecimiento. Rata.

SUMMARY

In this paper 50 one month old male rats were used. 25 of them were controled and the rest was stressed by a modification of Bonfill's technique. After being sacrificed at 1, 2, 4, 8 and 12 weeks a histochemical study (Alcian Blue technique) was made on the proximal growth plate of the tibias.

Results showed that the epiphyseal plates of stressed animals had very little avidity for Alcian Blue from the beginning to the end of the experiment. Initially controled animals showed a high avidity which progressively decreased. Staining was very similar in both groups of animals at the twelfth week.

It is suggested that stress causes an initial stop in the activity of proliferative condrocytes. This progressively recovers to become normal. Due to the time of decreased activity of growth plates, it is adviceable to avoid stressing situations in children with orthopaedic and traumatic troubles.

Key words: Stress. Growth Plate. Rat.

Introducción

La influencia que el stress emocional crónico ejerce sobre los componentes del aparato locomotor ha sido estudiada en muy pocas ocasiones. GARCÉS y SARRAT (1) comprobaron que el stress crónico da lugar a un enlentecimiento en la consolidación de las fracturas sin grandes alteraciones en la estructura del callo reparador. Posteriormente JIMÉNEZ y GARCÉS (2), utilizando el mismo modelo experimental, observamos que ratas en crecimiento sometidas a restricción de espacio vital crecían menos que otras controles durante un seguimiento máximo de seis semanas. Asimismo se evidenciaron importantes alteraciones en sus placas fisarias. Más recientemente comprobamos, con un estudio evolutivo más largo, que el tamaño de los animales stressados tiende a igualar al de los controles con el paso del tiempo (3). En otro trabajo, la altura de la fisis tibial, uno de los indicadores de la actividad de la misma (4), también fue significativamente mayor en los animales controles al principio de la experiencia; sin embargo llegó a medir lo mismo en ambos grupos al cabo de doce semanas (5).

Estos antecedentes parecen sugerir que el stress da lugar a un frenado en la actividad de los cartílagos de crecimiento, que tiende a recuperarse a medida que los animales se adaptan a esa situación. Para intentar aportar más datos a este tema, en este trabajo se realiza el estudio cualitativo de la presencia de proteoglicanos sulfatados, principales indicadores de dicha actividad.

Material y método

Hemos utilizado 50 ratas machos, cepa Sprague-Dowley, de un mes de edad y peso entre 75 y 95 gramos. 25 de

estos animales fueron introducidos en celdillas metálicas para restringir su espacio vital. Esta técnica es una modificación de GARCÉS (6) a la inicial de BONFILLS y cols. (7) para producir stress emocional crónico en los animales. Las jaulas se construyeron de tamaño suficiente para albergar animales adultos. Dentro de estas se colocó un tope deslizante que permitía adaptar el tamaño de la mismas al de los animales y de este modo aseguraba que estos pudiesen moverse aunque su espacio vital estuviese marcadamente reducido. Podían comer y beber «ad libitum».

Los otros 25 fueron permitidos vivir en condiciones normales y sirvieron como controles. 5 animales de cada grupo fueron sacrificados al cabo de 1, 2, 4, 8 y 12 semanas, su tibia derecha extraída, liberada de partes blandas y fijada en líquido de Bouin durante 24 horas. Tras descalcificación en solución de Schmorl, deshidratación progresiva e inclusión en parafina, los cortes fueron teñidos con la técnica del azul alcian de STEEDMAN y LISON (8).

Resultados

Después de la primera semana los animales controles mostraban una fuerte positividad al azul en toda la fisis. Esta era particularmente intensa en la sustancia intercelular de las zonas germinal y proliferativa. Los anillos perilacunares de la capa degenerada eran, asimismo, muy positivos y menos intensamente se teñían a este nivel los septos longitudinales y transversales. En los animales stressados la altura fisaria era bastante menor y casi toda la placa mostraba negatividad a captar el colorante azul. Únicamente algunos puntos aislados de la zona germinal y los núcleos de la zona hipertrófica se teñían de este color. El resto de la fisis presen-



FIGURA 1.— Fisis tibial una semana tras comenzar la experiencia. *a)* control, *b)* stressada. Mientras en el control toda la placa es positiva, en el stressado sólo lo son los núcleos de la capa hipertrófica y puntos aislados de la proliferativa. Azul Alcían 63X.

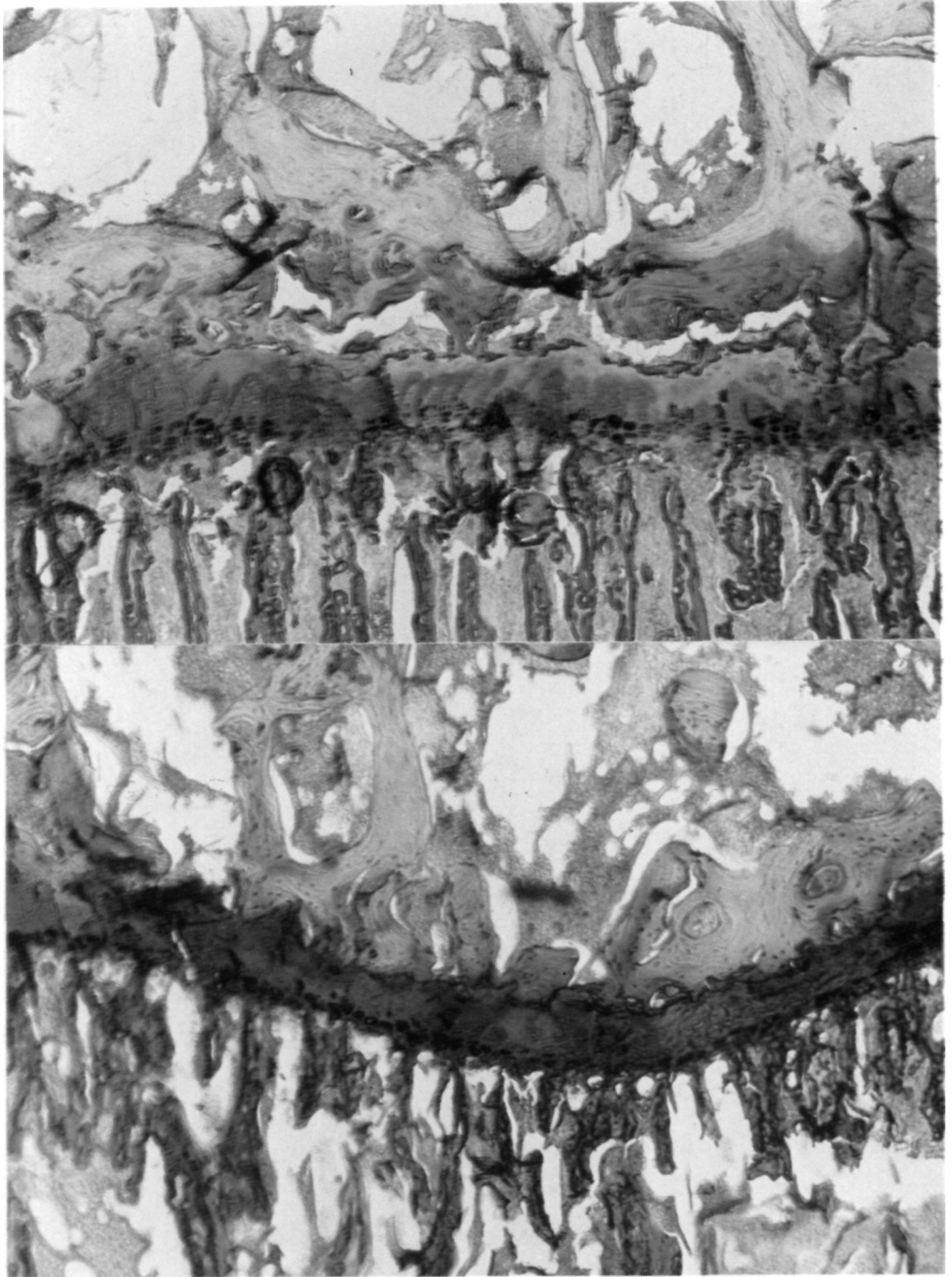


FIGURA 2. - Fisis a las doce semanas del comienzo. a) control, b) stressada. Ambas placas muestran ahora características tincionales muy similares. Azul Alcian 63X.

taba el color rojo utilizado como mordiente y que demostraba la ausencia de proteoglicanos sulfatados.

A partir de la segunda semana los animales controles presentaban sus cartílagos de crecimiento cada vez con menor afinidad por el azul. Esta disminución de captación comenzó por la capa germinal. La capa proliferativa ya no se teñía homogéneamente y dejó de tener apetencia por el colorante azul en la decimosegunda semana. La capa hipertrófica siguió mostrando positividad en sus núcleos durante toda la experiencia y la capa degenerada en los anillos perilacunares y septos longitudinales hasta la semana octava, en que la fue perdiendo para ser nula en la última semana.

En los animales stressados no varió el aspecto inicial a lo largo de toda la experiencia. De este modo siguieron observándose zonas aisladas en la capa proliferativa, substancia intercelular, que se teñían muy débilmente. También lo hicieron los núcleos de la capa hipertrófica pero permaneció de color rojo el resto de la fisis. La no variación en las características histoquímicas de los cartílagos de estos animales hizo que su aspecto se pareciera cada vez más al de los controles, hasta ser perfectamente superponible al cabo de las doce semanas.

Discusión

Aunque son bien conocidos los efectos que el stress crónico tiene sobre distintos órganos de la economía corporal, muy poco se ha estudiado sobre su influencia en el aparato locomotor. En un trabajo anterior, utilizando el mismo método de producir stress que en este, pudimos comprobar que la altura fisaria en estos animales fue alrededor del 25% de la de los controles al principio de la experiencia. Con el paso del tiempo la di-

ferencia entre ambos grupos fue reduciéndose hasta ser nula al cabo de las doce semanas. La disminución en la captación del azul alcán que progresivamente mostraron los animales controles en nuestro trabajo guarda relación directa con la pérdida de altura observada en este grupo anteriormente (5). Ambos factores representan la degeneración fisiológica del cartílago fisario.

La negatividad a captar el azul apreciada en casi toda la fisis de los animales stressados indica una muy baja producción de mucopolisacáridos ácidos. La síntesis de estos elementos es una de las principales funciones de las células de la capa proliferativa (9) y por ello, el hallazgo anterior demuestra la escasa actividad del cartílago de crecimiento en estos animales. Esta observación podría justificar la menor altura fisaria en este grupo desde el principio.

La disminución de la presencia de proteoglicanos sulfatados que mostraron los animales sometidos a restricción de espacio podría no ser debida al stress. Factores como la presión atmosférica, temperatura, medio ambiente, etc., fueron los mismos para este grupo y el control y por ello no consideramos que hayan sido responsables de las diferencias referidas. Únicamente creemos que existen dos factores que podían haber tenido alguna influencia: la nutrición y la disminución en la actividad y movimiento.

Con respecto al primero, obviamente la inanición da lugar a un descenso en la síntesis de proteoglicanos (10). Si bien no cuantificamos la comida consumida por ambos grupos de animales, los stressados demostraron incluso mayor voracidad y en ningún momento dieron muestras de inapetencia. Tampoco hemos encontrado referencias sobre la disminución de ingesta en animales stressados y, en cualquier caso, esta sería una manifestación más del síndrome.

Más discutible sería el segundo factor considerado. La inmovilización ha sido utilizada en numerosas ocasiones como agente stressante (7, 11, 12, 13). Sin embargo su uso para estudiar las repercusiones del stress sobre el aparato locomotor podría ser criticado por cuanto anula un componente de gran importancia en los mecanismos fisiológicos de este.

WRONSKY y MOREY (14) inmovilizando totalmente monos en crecimiento comprobaron una disminución en la formación de hueso trabecular. Aunque estos autores atribuyeron sus resultados a la falta de movimiento, reconocieron que pudieron ser condicionados por la situación de stress sufrida por los animales. De hecho se ha demostrado que la inmovilización incrementa los niveles de corticosteroides (15) y estos son las hormonas responsables de la mayor parte de las manifestaciones de la respuesta a la agresión (12, 16).

Por otra parte Viteri y cols. (17) con un modelo similar al nuestro observaron un menor crecimiento en sus ratas. Estos autores consideraron que la causa de este hallazgo fue la disminución de actividad y no el stress, ya que los niveles de catecolaminas y corticoides fueron normales. No tenemos datos acerca del método seguido para estas determinaciones pero, lo que consideramos fuera de toda duda, es que la restricción de espacio vital es causa de stress. Ello ha sido demostrado por la aparición de ulceraciones en la mucosa gástrica de los animales (6,7).

Sin duda es difícil valorar que porcentaje de los resultados fue debido a la falta de actividad y cual a la situación stressante, ya que los mismos se compararon con un grupo control. Para obviar este problema GARCÉS (18) inmovilizó en posición funcional uno de los miembros posteriores de ratas en crecimiento. Como el stress de esta situación influía por igual en ambos miembros del mismo animal,

los resultados dependieron exclusivamente de la falta de movimiento. Este autor observó un ligero, pero progresivo, incremento en la longitud de las tibias inmovilizadas, que llegaron a ser un 2% más larga que las contralaterales al cabo de cuatro semanas. Sus datos mostraron en todo momento una alta significación estadística.

Igualmente, con el mismo modelo experimental, GARCÉS y RAMÍREZ (19) comprobaron que tras la primera semana las fisis de las tibias de ambos lados mostraban una apetencia al azul alcian muy similar. Sin embargo, tras la cuarta semana las inmovilizadas captaban mucho más el colorante. Estas referencias sugieren que, al menos durante las cuatro semanas que duró el estudio realizado por los autores, la falta de movimiento no fue perjudicial para el crecimiento de las tibias y la síntesis de proteoglicanos en sus fisis.

La marcada disminución en el color azul, y por tanto en la presencia de proteoglicanos, mostrada por la fisis de los animales stressados desde el principio de la experiencia, permiten descartar a la falta de actividad como responsable de este hallazgo.

Aunque en este estudio no se cuantifica la síntesis de proteoglicanos sulfatados, su determinación cualitativa mediante la técnica del azul alcian da una idea bastante aproximada de su presencia (20). Nuestros hallazgos inducen a pensar que el efecto inicial del stress sería frenar la actividad fisiológica de los condrocitos proliferativos: su no división condicionaría la menor altura fisaria observada anteriormente (5) y la disminución en la síntesis de mucopolisacáridos ácidos la falta de captación del azul observada en este trabajo. La progresiva adaptación de los animales podría explicar la sucesiva tendencia a que se igualen ambos parámetros a los de los animales controles.

Si ya aceptamos que las alteraciones

referidas en este trabajo son debidas al stress, habría que preguntarse los mecanismos que conducen a las mismas. Responder esta cuestión es empresa hartamente difícil por cuanto no se conocen con exactitud todas las modificaciones que tienen lugar en el organismo ante esta situación.

La hipersecreción corticoidea se nos antoja como la principal responsable. Es conocido que en los cartílagos fisarios los corticoides disminuyen la proliferación celular y la captación de azufre (21) (lo cual demuestra una disminución en la síntesis de proteoglicanos sulfatados). Desconocemos, sin embargo, si la tendencia a la normalización de estos parámetros en nuestros animales se acompañó de una menor tasa plasmática de esas hormonas.

Otro factor a tener en cuenta sería la

aparición de modificaciones vasculares alrededor de las fisis. Si bien no tenemos constancia de su presencia, las deducimos por la vasoconstricción periférica observada por SOLOMON (22) en el stress. Esta daría lugar a cambios en las presiones parciales de oxígeno, de tanta importancia en el control de los mecanismos fisiológicos fisarios (23).

Aunque los mecanismos propuestos son meramente especulativos, a la vista de nuestros resultados creemos que el stress entorpece la normal actividad de los cartílagos de crecimiento. Teniendo en cuenta las reservas lógicas de la transpolación a clínica humana, nuestros hallazgos permiten sugerir, de un modo objetivo, el evitar las situaciones de tensión emocional en el tratamiento de niños con problemas ortopédicos o traumatológicos.

BIBLIOGRAFIA

1. GARCÉS, G. y SARRAT, R.: Modificaciones estructurales inducidas por el stress emocional en el callo de fractura. Estudio experimental. *Rev. Ortop. Traum.* 29: 149-156, 1985.
2. JIMÉNEZ DÍAZ, J. y GARCÉS, G.: Cambios estructurales en el cartílago de crecimiento de la rata blanca bajo el efecto del stress emocional. *Rev. Ortop. Traum.* 30: 141-146, 1986.
3. JIMÉNEZ DÍAZ, J. y GARCÉS, G.: Evolución estado-ponderal de ratas jóvenes sometidas a stress crónico. Datos no publicados.
4. SEINSHIMER, F. and SLEDGE, C.: Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J. Bone Joint Surg.* 63-A: 627-630, 1981.
5. GARCÉS, G. y JIMÉNEZ DÍAZ, J.: Estudio histomofométrico de la fisis tibial proximal de ratas sometidas a stress emocional crónico. Datos no publicados.
6. GARCÉS, G.: El sustrato anatómico de la emoción y su influencia en la consolidación de fracturas y cicatrización de heridas. Tesis Doctoral. La Laguna, 1983.
7. BONFILLS, S., DUBRASQUET, M. et LAMBRING, A.: Ulcera experimental de constrainte. Quelques applications du test de la poute de restriction. *Therapie* 16: 284, 1961.
8. DRURY, R. and WALLINGTON, E.: Carleton's Histological technique. *Oxford Univ. Press*, 5th Ed., Oxford, pp. 246-247.
9. BRIGHTON, C.: The growth plate. *Orthop. Clin. North Amer.* 15: 571-595, 1984.
10. AXELSSON, I.; LORENTZON, R. and PITA, J.: Biosynthesis of rat growth plate proteoglycans in diabetes and malnutrition. *Calcif. Tissue Int.* 35: 237-242, 1983.
11. KANT, G.; MEYERHOFF, J.; BUNNEL, B. et al.: Cyclic AMP and cyclic GMP responses to stress in brain and pituitary: stress elevates pituitary cyclic AMP. *Pharmac. Biochem. Behav.* 17: 1.067-1.072, 1982.
12. SELYE, H.: Stress in health and disease. Butterworth Reading, 1976.
13. BUNNEL, B.; KANT, G.; LENNOX, R. et al.: Pituitary cyclic AMP in rats is increased by psychological stress. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7: 282-292, 1981.
14. WRONSKY, T. and MOREY, E.: Inhibition of cortical and trabecular bone formation in the bones of immobilized monkeys. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 181: 269-276, 1983.
15. MASON, J.: Corticosteroid response to chair restraint in the monkey. *Am. J. Phys.* 222: 1.291-1.296, 1972.

16. EL FEKI, A.; SAKLY, M. et KAMOUN, A.: Incidence du gaz d'échappement sur l'activité corticosurrénalienne, la croissance générale et la variation de certains métabolismes intermédiaires chez le rat mâle en période de croissance. *Arch. Intern. Phys. Bioch.* 92: 167-177, 1984.
17. VITERI, F. citado por CANADELL, J. en Lesiones del cartilago de crecimiento. Ed. Eunsa, Pamplona, 1976.
18. GARCÉS, G.: Crecimiento femoro-tibial en miembros inmovilizados de rata. *Rev. Esp. Cir. Ost.* 21: 105-108, 1986.
19. GARCÉS, G. y RAMÍREZ, J.: Efectos de la inmovilización en posición funcional sobre los cartilagos de crecimiento tibiales: estudio histológico e histoquímico. *Rev. Ortop. Traum.* en prensa.
20. IPPOLITO, E.; MICKELSON, M., and PONSSETI, I.: A histochemical study of slipped capital femoral epiphysis. *J. Bone Joint Surg.* 63-A: 1.109-1.113, 1981.
21. SULTAN, Ch.: Facteurs d'influence et dépendances hormonales in POUS, J.; DIGMEGLIO, A.; BALDET, P. et BONNEL, F.: Cartilage de conjugaison et croissance. Doin Édit., Paris, pp. 92, 1980.
22. SOLOMON, G.: Peripheral vasoconstriction induced by emotional stress in rats. *Angiology* 15: 362-365, 1964.
23. BRIGHTON, C. and HEPPENSTALL, R.: Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. *J. Bone Joint Surg.* 53-A: 719-728, 1971.