

Estudio histoquímico de la fisis tibial de ratas diabéticas jóvenes

G. GARCES MARTIN (*), J. A. MEDINA HENRIQUEZ (*), A. LOPEZ ALONSO (**)
y J. A. RAMÍREZ GONZALEZ (*)

RESUMEN

Se realiza un estudio histoquímico, con la técnica del azul alcían, en la fisis tibial de ratas machos de un mes diabetizadas mediante inyección de streptozotocin. Se comparan los resultados con un grupo control comprobándose que tras la primera semana, aunque las fisis diabéticas son más estrechas, no existen diferencias en la captación del colorante; a partir de la segunda semana éstas muestran progresivamente menor avidéz por el azul alcían que los controles, indicando una menor producción de proteoglicanos, especialmente a nivel germinal y proliferativo. La precocidad en la aparición de alteraciones sugiere el observar más concienzudamente la posibilidad de problemas ortopédicos en el crecimiento de niños diabéticos, especialmente aquellos diagnosticados con retraso.

Descriptores: Diabetes. Cartílago de crecimiento. Histoquímica.

SUMMARY

A histochemical study, Alcian Blue technique, was made on the growth plate of the tibia in streptozotocin induced diabetic male rats. Results were compared with a control group. After the first week, although diabetic growth plates were thinner than controls, no differences in staining were found; from the second week diabetic epiphyseal plates progressively showed less avidity for Alcian Blue than control plates, mainly at the resting and proliferative zones. Because of the early changes in the growth plates of the rats, closer observation of diabetic children, specially those diagnosed with delay, is advised.

Key words: Diabetes. Growth Plate. Histochemical.

Introducción

Es sabido que la diabetes produce una serie de alteraciones metabólicas que se manifiestan en la mayor parte de los órganos de la economía corporal. Numerosos estudios bioquímicos han sido llevados a cabo para determinar las alteraciones que tienen

lugar en los cartílagos de crecimiento de animales jóvenes que padecen la enfermedad y de este modo hacer una aproximación a lo que sucede en el ser humano (1, 2, 3, 4). Sin embargo, no hemos encontrado referencias acerca de las características morfológicas de las fisis de animales diabéticos y por ello en un trabajo anterior (5) estudiamos la evolución microscópica de la fisis tibial en ratas jóvenes diabetizadas con streptozotocin. Nos pareció interesante que además debíamos conocer las alteraciones metabólicas que tienen lugar a nivel de los distintos

(*) Unidad de Investigación en Patología del Aparato Locomotor. Departamento de Anatomía del Colegio Universitario de Las Palmas.

(**) Cátedra de Traumatología y Cirugía Ortopédica de la Universidad de La Laguna, Tenerife.

componentes de la placa y en concreto las referidas a la síntesis de proteoglicanos, verdadero índice de la actividad de la misma (6). En este trabajo intentamos aportar datos que ayuden a conocer mejor el comportamiento fisario en la diabetes infantil.

Material y método

Hemos utilizado 40 ratas machos, cepa Sprague-Dawley, de un mes de edad y entre 90 y 100 gramos de peso. 20 sirvieron como controles y el resto fue diabetizado mediante inyección intraperitoneal de 70 mgs. de streptozotocin, siguiendo la técnica de GANDA y cols. (7). El criterio para considerar la diabetes fue la determinación de glucemia superior a 250 mgs. Los animales fueron divididos en cuatro subgrupos de cada grupo, control y diabético, y sacrificados en número de 5 al cabo de 1, 2, 4 y 8 semanas. Dos tipos de parámetros fueron determinados:

A) *Evolución de la talla.* Totalmente extendidos sobre su plano ventral fueron medidos desde

el hocico hasta la punta de la cola. La correlación estadística se realizó con una T-Student en ordenador HP-3000.

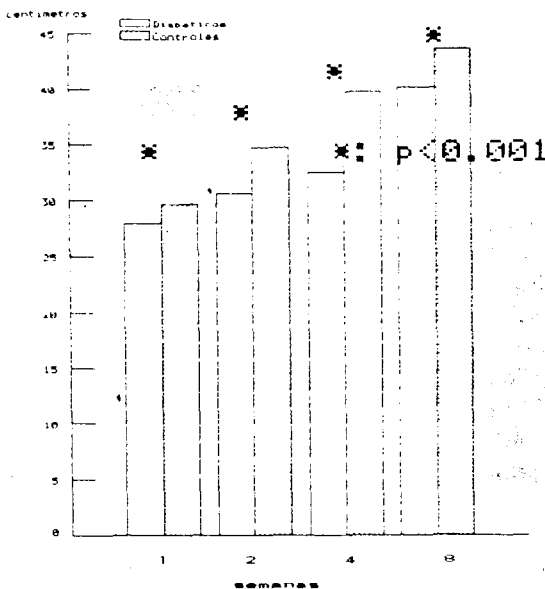
B) *Histoquímica.* Estudio de la fisis proximal de la tibia derecha tras liberarla de partes blandas, fijarla en líquido de Bouin durante 24 horas, decalcificarla en solución de Schmorl, deshidratarla en alcoholes progresivos e incluirla en parafina. Los cortes obtenidos fueron teñidos con la técnica del azul alcian descrita por STEEDMAN (8) y LISON (9); mediante la misma se obtiene una coloración azul ante la presencia de mucopolisacáridos ácidos y aunque no es una determinación cuantitativa, da una idea bastante aproximada de la actividad fisaria.

Resultados

La evolución de la longitud de las ratas diabéticas fue desde el principio significativamente menor que la de las controles (Gráfica 1). Considerando el tamaño inicial de cada subgrupo separadamente pudo com-

DIABETES Y CRECIMIENTO

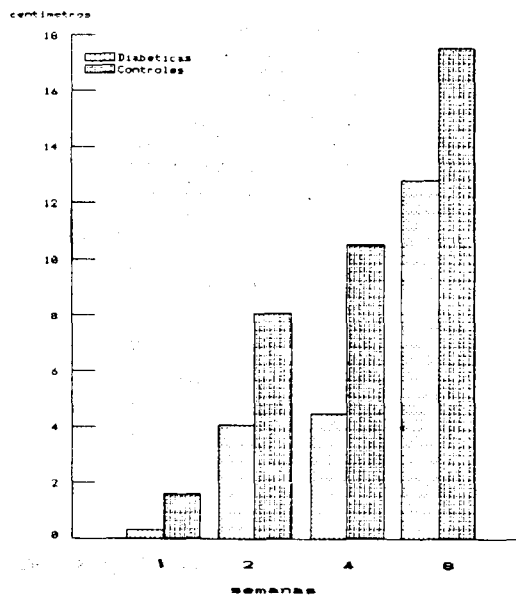
Evolucion de la talla



GRÁFICA 1.- Evolución de la longitud de los animales tras comenzada la experiencia; $p < 0.001$ en todos los periodos.

DIABETES Y CRECIMIENTO

Incremento en longitud



GRÁFICA 2.- Incremento en longitud considerando cada subgrupo separadamente.

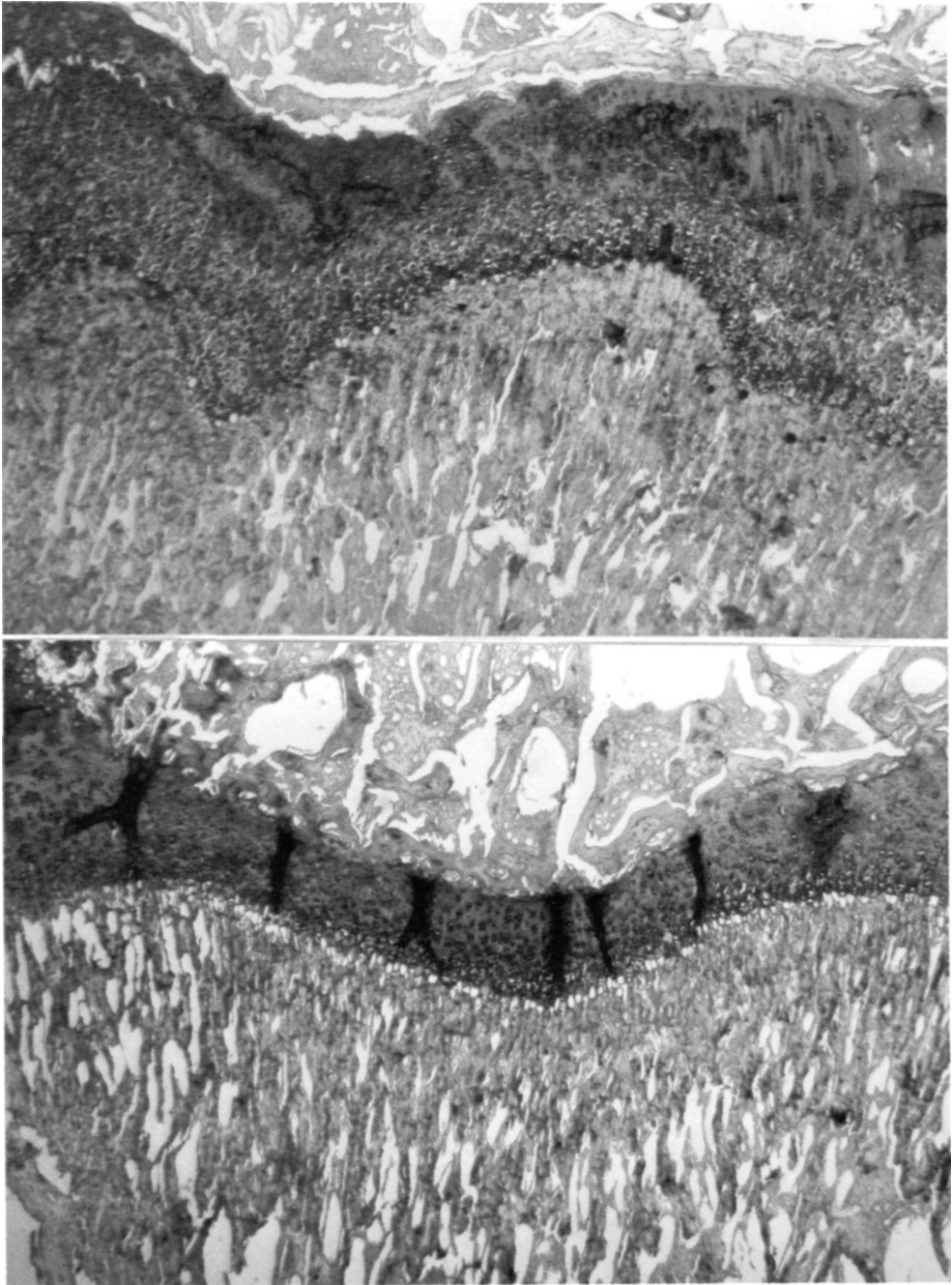


FIG. 1.- 1 semana de comenzada la experiencia. a) Control, b) Diabética. Puede apreciarse que la positividad al azul alcian es igual en ambas placas aunque la diabética sea más estrecha. Azul alcian, 25 X.

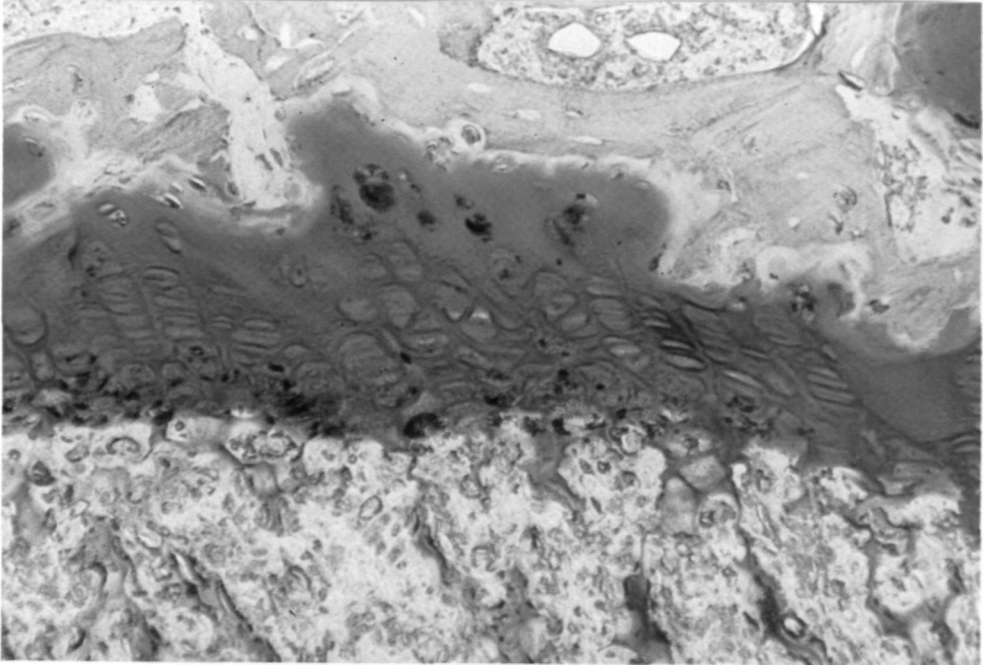
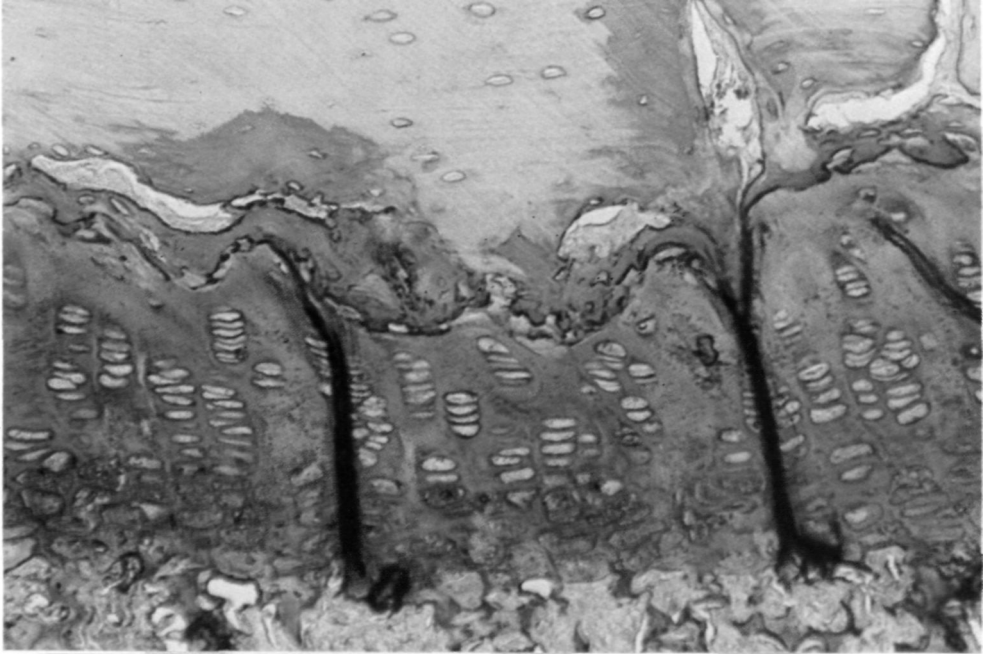


FIG. 2.- Control 8 semanas. Es evidente la positividad al azul en algunas zonas de la capa proliferativa y en casi toda la hipertrofica. Azul alcian, 160 X.

FIG. 3.- Diabética 8 semanas. La placa es negativa prácticamente en su totalidad salvo puntos muy aislados. Azul alcian, 160 X.

probarse que el incremento longitudinal fue progresivamente menor en el grupo diabético (Gráfica 2).

Histoquímica

Al cabo de la primera semana las fisis diabéticas eran bastante más estrechas que las controles, pero no se apreciaron diferencias en cuanto a la captación del colorante ya que en ambos grupos la distribución de la positividad al azul alcian fue muy similar en todas las capas (Fig. 1A y 1B); únicamente la capa degenerada, al presentar mayor cantidad de lagunas anucleadas, resaltaba por su particularidad.

Después de dos semanas, en el grupo diabético, aunque las diferencias no eran excesivamente llamativas, podía apreciarse que la capa germinal captaba el colorante azul mucho menos homogéneamente, con grandes zonas donde la captación era totalmente nula. A nivel proliferativo la positividad era también menor, con mayor cantidad de zonas donde no se depositaba el colorante azul pero con una distribución similar al grupo control. En las capas hipertrófica y degenerada la disposición del colorante era muy similar en ambos grupos, con intensa positividad a nivel nuclear y sólo resaltando la menor cantidad de células de los diabéticos.

Tras cuatro semanas en los diabéticos se observaban diferencias substanciales ya que aunque en los controles casi toda la germinal era negativa, el inicio de la proliferativa era bastante positivo y homogéneo para ir disminuyendo la captación a medida que se avanzaba hacia la metafisis. Por el contrario en aquéllos la negatividad ocupaba no sólo la capa germinal sino también la proliferativa salvo en zonas muy aisladas donde se observaban islotes de positividad, volviendo a ser la capa hipertrófica muy similar en su captación al grupo control.

Después de ocho semanas, aunque en los controles se había ido perdiendo positividad al azul, persistían grandes zonas en las ca-

pas germinal y proliferativa cuya matriz intersticial seguía captando intensamente el colorante ácido al igual que lo hacía la capa hipertrófica prácticamente en la totalidad de sus células (Fig. 2). En los diabéticos prácticamente toda la placa se había negativizado y tan sólo persistían en zonas muy aisladas pequeñas áreas de color azul, principalmente en las capas hipertrófica y degenerada; no obstante, su presencia era infrecuente incluso en esas zonas (Fig. 3).

Discusión

El efecto de la diabetes no tratada sobre el crecimiento en seres humanos está sujeto a discusión. Algunos autores señalan que en el momento del diagnóstico los niños eran más altos que los controles de su edad (10, 11), mientras que otros no coinciden con estas observaciones (12, 13). La mayoría sin embargo, indica el déficit de crecimiento en niños diabéticos no bien controlados (14, 15, 16) a pesar de que no están claros los mecanismos por los que se produce.

Nosotros observamos que una vez adquirida la enfermedad, el crecimiento longitudinal de las ratas fue siempre significativamente menor que el de las controles, llegando incluso a pérdidas cercanas al 20 por 100, hallazgo que coincide con lo publicado por otros autores (2). A pesar de la abundancia de datos en la literatura, el mecanismo por el que este retraso sucede no está claro, si bien parece ser un descenso en la actividad de la somatomedina la razón principal del mismo (16).

En nuestro estudio comprobamos que el retardo en el crecimiento comienza a aparecer al cabo de muy poco tiempo de adquirida la diabetes y ya desde entonces encontramos alteraciones en la fisis. En un trabajo anterior pudimos observar que desde el principio la fisis se hizo más estrecha y hubo una disminución de todos los compo-

nentes celulares, siendo especialmente llamativa la relativa acelularidad de la zona germinal que se mantuvo a lo largo de toda la evolución controlada (5).

Por otra parte llama la atención el hecho de que a pesar de una importante disminución en la anchura de la placa fisaria, las características histoquímicas en los animales diabéticos no difieren de los controles durante la primera semana. Ello contrastaría con el hallazgo de AXELSSON y cols. (1), que observan en estos animales una importante disminución de la síntesis de proteoglicanos, hasta el 94 por 100, en el mismo tiempo; sin embargo, esto podría justificarse porque al ser más estrecha la fisis, la producción de agregados proteoglicanos es indudablemente menor a pesar de que la distribución por capas sea similar en ambos grupos de animales. De este modo, deberíamos asimilar que la producción de mucopolisacáridos no se ve disminuida porque las células sintetizan menor cantidad sino porque la superficie fisaria ha sufrido un importante deterioro.

A medida que pasa el tiempo comprobamos que en los animales diabéticos la captación del colorante azul demuestra una caída en la producción de mucopolisacáridos áci-

dos progresivamente. La primera capa en verse afectada es la zona epifisaria de la proliferativa, verdadera capa germinal del cartílago de crecimiento (17) y que requiere gran cantidad de energía para realizar sus funciones de producción de matriz y proliferación celular. Esta energía se obtiene fundamentalmente de la glucólisis anaeróbica, siendo el lactato el principal metabolito final (18). HOUHG y cols. (3) demostraron una disminución en la producción de lactato de más del 40 por 100 en cartílagos fisarios de ratas diabéticas, indicando el déficit de potencial energético que tenía lugar; esto justificaría la diferencia de avidez por el colorante ácido entre ambos grupos de animales.

Podemos concluir por tanto que la insulinopenia da lugar a un «agotamiento» progresivo de la función de la fisis que inicialmente se traduce en una disminución de la proliferación celular y posteriormente en una pérdida de la capacidad de sintetizar proteoglicanos. No hemos encontrado referencias acerca de distinta predisposición en los niños diabéticos a padecer lesiones fisarias, no obstante, aunque la transposición a clínica humana debe hacerse siempre con reserva, creemos interesante señalar esta observación en razón a nuestros resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. AXELSSON, I.; LORENTZON, R. and PITA, J. (1983): Biosynthesis of rat growth plate proteoglycans in diabetes and malnutrition. *Calcif. Tissue Int.*, 35: 237-242.
2. BAXTER, R.; BROWN, A. and TURTLE, J. (1980): Association between serum insulin, serum somatomedin and liver receptors for human growth hormone in streptozotocin diabetes. *Horm. Metab. Res.*, 12: 377-381.
3. HOUGH, S.; RUSSELL, J.; TEITELBAUM, S. and AVIOLI, L. (1983): Regulation of epiphyseal cartilage metabolism and morphology in the chronic diabetic rat. *Calcif. Tissue Intern.*, 35: 115-121.
4. WEISS, R. and REDDI, A. (1980): Influence of experimental diabetes and insulin on matrix-induced cartilage and bone differentiation. *Am. J. Physiol.*, 238: E200-207.
5. GARCÉS, G.; MEDINA, J. A. y LÓPEZ ALONSO, A.: Evolución del crecimiento en ratas diabéticas. Estudio histológico de la fisis tibial. Datos no publicados.
6. SEINSHEIMER, F. and SLEDGE, C. (1981): Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J. Bone Joint Surg.*, 63-A: 630-636.
7. GANDA, O.; ROSSINI, A. and LIKE, A. (1976): Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*, 25: 595-603.
8. STEEDMAN, H. (1950): *Quart. J. Micr. Sci.*, 91: 477.
9. LISON, L. (1954): *Stain Technol.*, 29: 131.
10. DRAYER, N. (1974): Height of diabetic children at onset of symptoms. *Arch. Dis. Child.*, 49: 616-620.
11. EDELSTEN, A.; HUGHES, J.; OAKES, S.; GORDON, I. and SAVAGE, D. (1981): Height and skeletal maturity in children with newly-diagnosed juvenile-onset diabetes. *Arch. Dis. Child.*, 56: 40-44.
12. EVANS, N.; ROBINSON, V. and LISTER, J. (1972): Growth and bone age of juvenile diabetics. *Arch. Dis. Child.*, 47: 589-593.
13. JIVANI, S. and RAYNER, P. (1973): Does control influence the growth of diabetic children? *Arch. Dis. Child.*, 48: 109-115.
14. HORNER, J.; KEMP, S. and HINTZ, R. (1981): Growth hormone and somatomedin in insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 53: 1148-1153.
15. PETERSEN, H.; KORSGAARD, B.; DECKERT, T. and NIELSEN, E. (1978): Growth, body weight and insulin requirement in diabetic children. *Acta Paed. Scand.*, 67: 453-457.
16. WINTER, R.; PHILIPS, L.; KLEIN, M.; TRISMAN, H. and GREEN, O. (1979): Somatomedin activity and diabetic control in children with insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 28: 952-954.
17. BRIGHTON, C. (1984): The growth plate. *Orthop. Clin. North. Amer.*, 15: 571-595.
18. PICARD, J. and CARTIER, P. citados por HOUGH, S. et al. (3).