

Alteraciones fisarias tras radiación láser

A. MAESTRO* A. PÉREZ CASAS** M. E. BENGOCHEA** y A. MURCIA*

* Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital de Cabueñes. Gijón. ** Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.

Resumen.—Ante el auge actual de la radiación láser y al no encontrar bibliografía referente al posible efecto sobre el cartílago de crecimiento, hemos decidido hacer una valoración del mismo en un modelo experimental. Se utilizaron 50 ratas, estableciéndose cinco grupos de estudio de 10 animales cada uno, dependiendo de la dosis de radiación aplicada percutáneamente sobre la fisis femoral distal. Tras el estudio ultraestructural, histoquímico y morfométrico, hemos observado una serie de alteraciones indicadoras de un daño celular directo. Los hallazgos permiten concluir que este tipo de radiación está contraindicado absolutamente durante la fase de crecimiento óseo o en el esqueleto inmaduro.

PHYSEAL DAMAGE AFTER LASER RADIATION

Summary.—In view of the present importance of Laser Radiation, and due to the lack of references about its effects on the growth cartilage, we designed an experimental model in order to asses it. A total of 50 rats were used, establishing five groups of study at 10 animals each, depending on the dosis of radiation applied percutaneously on the distal femoral phisys. After the structural, histochemical and morphometric study, we observed a series of alterations indicating a direct celular damage at the physion. From the results, it is concluded that laser radiation should be on absolute contraindication during the phase of bone growth or in the immature skeleton.

INTRODUCCIÓN

En 1917, Albert Einstein expuso por vez primera el principio de la emisión estimulada de la radiación, fundamentándose sobre dicho principio el fenómeno láser (Ligth Amplification by Stimulation Emission of Radiation). El mecanismo de acción de la radiación láser está basado en la absorción de la energía por el tejido (1, 2), desarrollando unos efectos directos (bioquímico, bioeléctrico y bioenergético) e indirectos (bioestimulante y vasodilatador).

Son numerosos los trabajos que demuestran los efectos de la radiación láser sobre distintos tejidos (3-7), con distintas aplicaciones clínicas como discectomías (8-11), artroscopias (12-18), extracción de cemento (19, 20) o suturas de tejidos (21-25).

Teniendo en cuenta estos efectos, y al no encontrar datos bibliográficos referentes al posible efecto de la radiación láser sobre el cartílago de crecimiento, nos hemos propuesto la realización del presente trabajo para valorar la repercusión de este tipo de radiación sobre la fisis de animales de experimentación, mediante un estudio ultraestructural, histoquímico y morfométrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron 50 ratas blancas machos de la cepa Wistar, de 45 días de edad y pesos comprendidos entre los 200 y 270 grs. procedentes todos ellos del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo.

La radiación de los animales se realizó con un aparato LASER IR-200M (Probionic SA.) cuyas características técnicas son: frecuencia 50/60, longitud de onda 904nm., potencia máxima de pico 50 watios, ángulo de salida de 1° por colimación de lente y ancho de impulso al 50% de emisión de 200 nseg. (Fig. 1).

La aplicación fue percutánea de forma circular sobre la fisis femoral distal del animal, tras el rasurado de la

Correspondencia:
Dr. ANTONIO MAESTRO
Cabres, 92 - 2° C
33201 Gijón



Figura 1. Modelo de radiación láser utilizada (Probionic S.A.).

zona y adoptando una posición en máxima flexión de la rodilla (Fig. 2).

Los animales fueron divididos en 5 grupos de 10 animales cada uno, siendo un grupo control y cuatro experimentales. Estos cuatro grupos experimentales se establecieron en base a los protocolos de radiación recibida, que en correlación a las usadas en humanos y dentro de rangos utilizados por otros autores, fueron dosis únicas de 3 y 6 julios, y dosis acumulativas (4 sesiones de una dosis cada 48 horas) de 12 y 24 julios respectivamente, como se expone a continuación:

GRUPO CONTROL (N = 10).

GRUPO I (N=10) ... Dosis única de 3 Julios.

GRUPO II (N= 10) ... Dosis única de 6 Julios.

GRUPO III (N= 10) ... Dosis acumulativa de 12 Julios (3x3x3x3).



Figura 2. Aplicación de la radiación sobre la extremidad distal del animal.



Figura 3. Dosis única de 3 Julios (Azoc. 1750x). Se aprecia una notoria desorganización celular en el estrato seriado.

— GRUPO IV (N=10) ... Dosis acumulativas de 24 Julios (6x6x6x6).

El sacrificio de los animales se realizó a las 24 horas de la última irradiación.

La técnica empleada para el estudio estructural fue el Azocarmín, y para el estudio histoquímico el PAS-Azul Alcán. Se realizó un estudio morfométrico mediante un procesador de imágenes Kontron, teniendo en cuenta la observación de los siguientes indicadores: Área de la esfera, Diámetro del círculo equivalente, Volumen de la esfera y Espesor del cartílago o Altura fisaria. Estos indicadores se analizaron en los núcleos y en los citoplasmas de las células condrocitarias de los cartílagos de crecimiento.

Para la valoración estadística de los resultados morfométricos se utilizó un estudio para muestras pareadas con el programa Epistat, y una correlación de datos mediante el índice de Pearson, calculando la «T de Student».

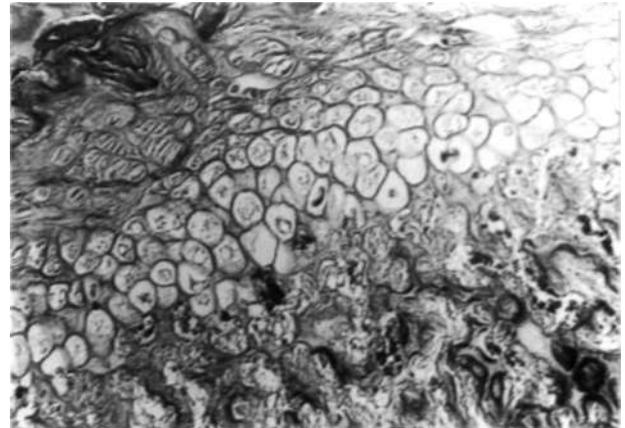


Figura 4. Dosis única de 6 Julios (Azoc. 700x). Hiperplasia celular muy importante en estrato de células hipertróficas.

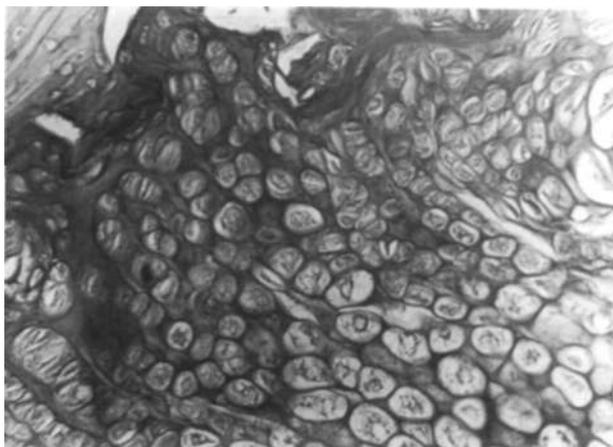


Figura 5. Dosis única de 6 Julios (P.A.S. 800x). Marcada la positividad a la reacción P.A.S. a nivel de la placa basal.

RESULTADOS

— *Grupo I* (Dosis única de 3 Julios): En estos animales se aprecia una alteración en la integridad es-



Figura 6. Dosis acumulativa de 12 Julios (Azoc. 700x). Prominente invasión vascular procedente de la zona metafisaria del cartílago.

tructural del cartílago, con cierta desorganización y menor celularidad en el estrato seriado, que presenta núcleos celulares pequeños y picnóticos y con imágenes de cariorrexis.

Existe una ruptura de continuidad en muchas columnas celulares con lo cuál las pilas o columnas son muy polimorfas desde el punto de vista condrocitario.

La capa germinal o de reserva se presenta muy estrecha, con pocos condrocitos, los cuáles están aplastados y carecen de núcleos, y el estrato degenerativo es rico en lagunas vacías (Fig. 3).

La matriz cartilaginosa de la físis está constituida por una mezcla de ambos tipos de mucopolisacáridos (sulfatados y no sulfatados), al igual que la lámina de separación interpuesta entre físis y tejido óseo epifisario o placa basal.

— *Grupo II* (Dosis única de 6 Julios): El estrato germinal aparece con condrocitos de muy pequeño

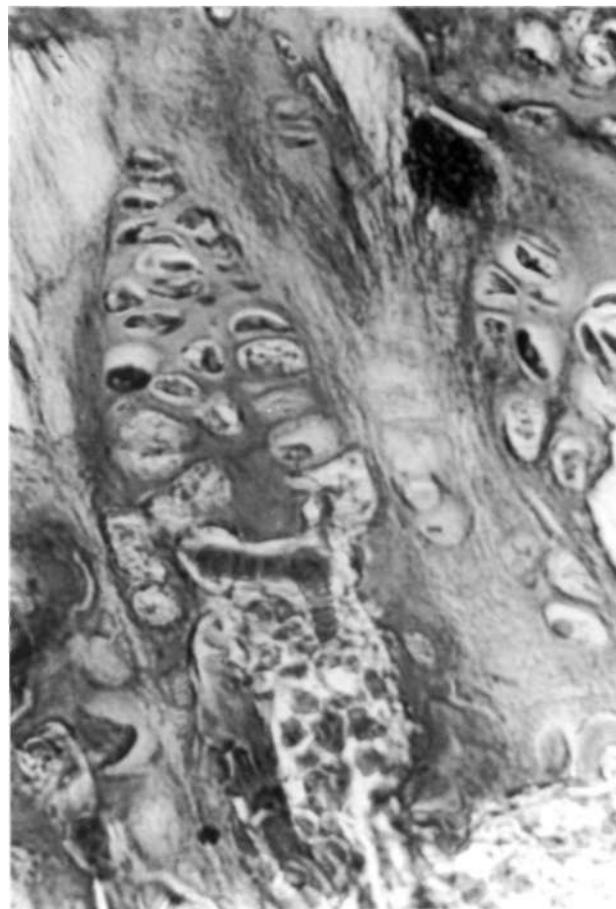


Figura 7. Dosis acumulativa de 12 Julios (P.A.S. 1750x). Desaparición de estrato hipertrofico e invasión vascular hasta estrato seriado, con alteraciones en la basofilia de la matriz intercelular.

tamaño. Se puede apreciar una muy notoria disminución celular en el estrato seriado, al contrario que la tercera capa o capa de células hipertróficas que es muy gruesa (Fig. 4), con condrocitos de gran tamaño.

La matriz cartilaginosa ha sufrido cambios similares en calidad, pero más pronunciados que la del cartílago irradiado con dosis única de 3 Julios, y aparece teñida en color violeta pálido, indicando deplección de los mucopolisacáridos sulfatados y no sulfatados.

La placa basal interpuesta es, por el contrario, muy rica en mucopolisacáridos neutros, lo que le confiere una tonalidad marcadamente roja; dicho en otros términos, ofrece fuerte positividad P.A. S. (Fig. 5).

— *Grupo III* (dosis acumulativa de 12 Julios): En este grupo hemos observado una importante alteración en la zona proliferativa del cartílago de crecimiento, con desaparición de numerosas columnas

celulares o pilas, y los espacios anteriormente ocupados por ellas han sido invadidos por muy prominentes formaciones conjuntivo-vasculares, siendo las cavidades medulares muy abundantes (Fig. 6).

La capa de células hipertróficas ha perdido su continuidad, habiendo quedado reducida a zonas separadas, siendo la causa de esta fragmentación, obviamente, la invasión del cartílago por las formaciones anteriormente citadas procedentes de la medular contenida en las celdillas o aréolas del tejido óseo metafisario o tejido esponjoso primario (Fig. 7).

La matriz ha sufrido disminuciones muy considerables en su basofilia, y en diferentes lugares las fibras colágenas han quedado desnudas, siendo visibles a la observación microscópica.

— *Grupo IV* (dosis acumulativa de 24 Julios): En la físis de estos animales el estrato seriado o proliferativo ha perdido columnas celulares enteras, y las existentes están fragmentadas y son de poca altura,



Figura 8. Dosis acumulativa de 24 Julios (Azoc. 1750x). Importante pérdida celular en estrato seriado con claros signos de necrosis celular.

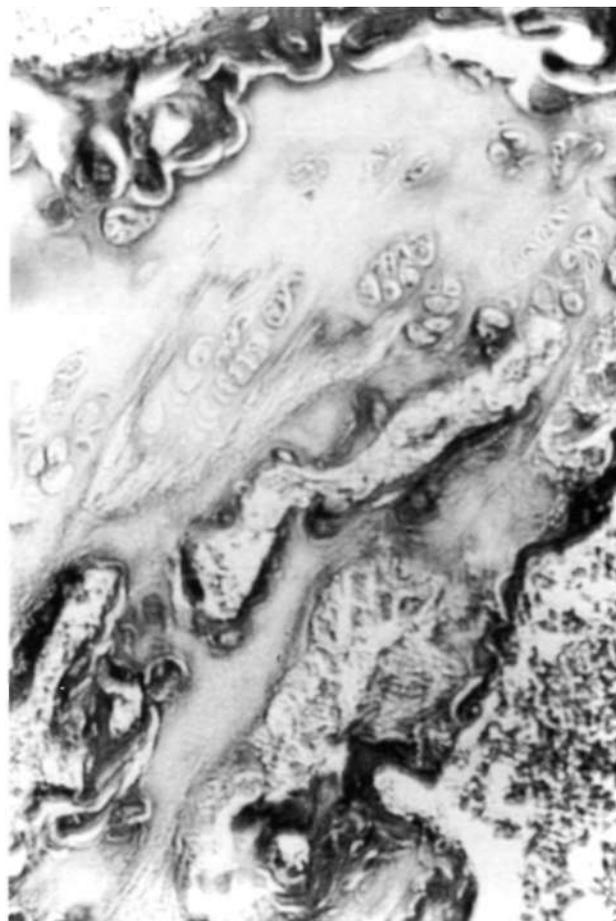


Figura 9. Dosis acumulativa de 24 Julios (Azoc. 800x). Alteraciones en el armazón colágeno de la matriz cartilaginosa con distintos índices de refracción.

Tabla I: Valores nucleares de área, diámetro y volumen, y espesor del cartílago de las distintas poblaciones estudiadas, con su procesado estadístico (*: $p < 0,05$).

	Area	Diámetro	Volumen	Espesor
3 jul.	T: 0,8566 p: 0,3924	0,4609 0,6451	1,2682 0,2058	0,5052 0,6142
12 jul.	T: 6,5421 p: <10(E-6)*	3,6757 2,8473(E-2)*	9,2662 <10(E-6)*	3,1373 2,0665(E-3)*
6 jul.	T: 2,5013 p: 1,3286(E-2)*	1,4293 0,1543	3,5050 5,5092(E-4)*	1,3503 0,1791
24 jul.	T: 9,1986 p: <10(E-6)*	5,243 <10(E-6)*	17,9401 <10(E-6)*	1,9324 5,5351(E-2)*

reuniéndose sus condrocitos en pequeños grupos, y mostrando claros signos necróticos (Fig. 8).

La capa de células hipertróficas presenta importantes alteraciones, lo mismo que en los animales del experimento precedente, con fragmentación, reduciéndose muy considerablemente la celularidad de esta capa. Muchos condrocitos contienen núcleos picnóticos, y citoplasmas claros sin ningún tipo de estructura organizada, y las cápsulas vacías del cuarto y último estrato (zona degenerativa) están invadidas por numerosas formaciones vasculo-conjuntivas, que al igual que en el experimento precedente son pobres en sustancia P.A.S. positiva.

El gel que es la matriz cartilaginosa ha modificado su índice de refracción, haciéndose diferente al de las fibras colágenas, por cuyo motivo estas son visibles en muchos puntos de las preparaciones histológicas, y por el contrario las trabéculas óseas en vías de neoformación se muestran muy basófilas (Fig. 9).

En las tablas I y II se encuentran reflejados los resultados morfométricos, así como el procesado estadístico de las poblaciones estudiadas.

DISCUSIÓN

Una disminución de grosor del cartílago de crecimiento o altura fisaria es el hecho más destacable que ocurre tras la aplicación de la radiación láser. A dosis acumulativas de 12 y 24 Julios condiciona un estrechamiento de significación estadística ($p < 0,05$) más notable que las dosis únicas de 3 y 6 Julios que no tienen rango de variación significativa (tabla I).

Al existir una relación directa entre la capacidad funcional y el grosor del cartílago (26, 27), lo hemos interpretado como una menor capacidad de respuesta funcional del cartílago, que consideramos

debido al menor número de células viables en el mismo, como consecuencia del efecto deletéreo de la radiación láser.

Esta disminución del grosor del cartílago o altura fisaria presenta su máxima expresión en el estrato seriado o proliferativo, que en el animal control ocupa prácticamente la mitad del grosor de la fisis, llegando a producir una casi total desaparición cuando se utilizaron las dosis máximas (12 y 24 Julios).

En todos los experimentos esta capa seriada sufrió alteraciones de la morfología y celularidad de sus columnas con incurvaciones o rupturas de éstas en varias masas globulosas, con signos de clara regresión celular respecto a los grupos control.

Tras el análisis morfométrico de las imágenes mediante técnicas informáticas, y consiguientemente evitando el error de observación citado por otros autores (28), los valores obtenidos en los animales sometidos a las distintas dosis de radiación láser revelaron una disminución significativa ($p < 0,05$) de los tres indicadores citoplasmáticos (tabla II), siendo menor este decremento en el grupo experimental al que se administró la mínima dosis (3 Julios), que fueron los únicos animales que no sufrieron modificación en uno de sus indicadores, el diámetro.

Asimismo, hemos encontrado un descenso significativo ($p < 0,05$) en los tres indicadores cariométricos (tabla I), siendo los valores más significativos en aquellos animales a los que se les administró las máximas dosis de radiación láser (12 y 24 Julios).

Teniendo en cuenta la relación existente entre los valores nucleares y el grado de actividad funcional (29), hemos interpretado estas variaciones en los distintos valores como una muy notoria disminución de la actividad condrocitaria, que consideramos debido a un menor número de condrocitos funcionalmente

activos por el daño celular directo ejercido por la radiación láser, que desde el punto de vista clínico conllevará a un menor crecimiento óseo.

La matriz cartilaginosa se altera en todos los experimentos, con modificaciones en la reacción P.A.S.-Azul Alcían, por depósito de ambos tipos de mucopolisacáridos en las capas hipertrófica y degenerativa.

El índice de refracción de la sustancia fundamental decae mucho, por lo que las fibras colágenas se hacen visibles en algunos puntos, lo que pensamos podría ser debido a un aumento en la producción de fibras colágenas (30) y al efecto térmico de la radiación láser.

El citado efecto térmico se basa en la absorción de la energía por parte de estructuras coloreadas o con gran poder de absorción, que transforman esta energía en calor.

Al producir temperaturas de aproximadamente 70°, la radiación láser altera las propiedades físicas de las fibras colágenas aumentando su rigidez y produce la evaporización del agua, lo que a temperaturas mayores de 100°, y asociado a una alteración en las proteínas celulares conllevaría a una destrucción del tejido (20).

Estas alteraciones térmicas encuentran su máxima expresión en los animales sometidos a mayor número de aplicaciones (12 y 24 Julios, especialmente este último).

Los fenómenos de erosión en la capa profunda del cartílago de crecimiento son muy notorios. En las cavidades resultantes penetran formaciones conjuntivo-vasculares con células mesenquimatosas indiferenciadas responsables del proceso de osificación, efecto éste ya conocido tras la aplicación de radiación láser sobre el cartílago articular (31) y en relación con el callo fracturario como células endoteliales hiperplásicas y en íntima relación con las células preosteogénicas (7).

Tales formaciones son muy abundantes y penetran en los estratos de células hipertróficas y seriado, que como se comentó precedentemente ha perdido gran número de columnas condrocitarias, con reabsorción de los tabiques intercelulares y presencia de condrocitos en fase terminal.

La susceptibilidad a las radiaciones, como se sabe, varía importantemente en función de la edad y consiguientemente del grado de maduración de tejido, y así una pequeña cantidad de radiación puede actuar excitando ciertas funciones celulares, una cantidad media ejerce una acción depresiva sobre la célula, y grandes dosis de radiación alteran la capacidad funcional de la célula llegando a producir la necrosis de la misma (32).

Trabajos clásicos ya han puesto de manifiesto el efecto deletéreo de las radiaciones sobre el tejido osteo-cartilaginoso (33), produciendo lesión celular directa y otros efectos indirectos por alteración vascular local-regional, siendo en el esqueleto en crecimiento las células cartilaginosas de las placas epifisarias muy vulnerables a la radiación y como consecuencia alterando el crecimiento.

A las radiaciones gamma se ha atribuido una detención temporal del crecimiento (34), encontrando alteraciones de la mitosis celular a las 24 horas de la irradiación, así como una disminución del espesor del cartílago, con tumefacción de los condrocitos, y desaparición de las células de la capa seriada.

Según nuestras observaciones, la radiación láser condiciona sobre el cartílago de crecimiento importantes alteraciones en las fases de proliferación, maduración, y osificación del cartílago por lesión celular directa, que creemos es debido al reconocido estímulo trófico y energético sobre las células (35), habiéndose obtenido efectos similares de forma experimental con los ultrasonidos aplicados a dosis altas y continuadas, produciendo una menor capacidad de crecimiento de las epífisis (36).

Tabla II: Valores citoplasmáticos de área, diámetro y volumen, de las distintas poblaciones estudiadas, con su procesado estadístico (*: $p < 0,05$).

	Area	Diámetro	Volumen
3 Jul.	T: 3,4716 p: 6,4034(E-4)*	1,5943 0,1131	5,6366 <10(E-6)*
12 Jul.	T: 41,4601 p: <10(E-6)*	16,9035 <10(E-6)*	81,1998 <10(E-6)*
6 Jul.	T: 38,0913 p: <10(E-6)*	15,0499 <10(E-6)*	76,7061 <10(E-6)*
24 Jul.	T: 37,8764 p: <10(E-6)*	14,8282 <10(E-6)*	76,8574 <10(E-6)

CONCLUSIONES

La aplicación de radiación láser sobre el cartílago de crecimiento determina en él mismo importantes alteraciones, fundamentalmente en sus fases de proliferación e hipertrofia, con una relación directa entre el grado de lesión celular y la intensidad de la radiación.

Por las importantes repercusiones clínicas que dicha radiación origina, nos permitimos defender la contraindicación absoluta de la radiación del cartílago de crecimiento con láser, bien directamente o en su vecindad durante el crecimiento óseo, es decir hasta una vez realizado el cierre fisario.

Bibliografía

1. **Koebner H.** Los láseres en medicina. Su historia. *Invest Clin Laser* 1986; 1: 33-5.
2. **Mester E, Mester AF, Mester A.** The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985; 5: 31-9.
3. **Basford J.** Low-energy laser treatment of pain and wounds: hype, bone or hokum. *Mayo Clin Proc* 1986; 61: 671-5.
4. **Lyons R, Abergel R, White R, Dwyer R, Castel J, Vitto J.** Bioestimulation of wound healing in vivo by a helium neon laser. *Ann Plast Surg* 1987; 18: 47-50.
5. **Cobo J, Hernández L, García M, Blanco J.** El láser en la profilaxis de la osteonecrosis mandibular. *Invest Clin Laser* 1986; 1: 16-8.
6. **Hernández L.** Respuesta estructural e inmunocitoquímica del eje hipofiso-tiroideo a la radiación láser; estudio bioquímico y biomolecular. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 1988.
7. **Hernández T, Robles D, Martínez F.** Efecto de la irradiación con láser de He-Ne en el callo de fractura experimental. Repercusión ultraestructural, morfométrica y hormonal. *Rev Orthop Traum* 1990; 34: 84-91.
8. **Choy D, Allman P, Case R, Trokel S.** Laser radiation at various wavelengths for decompression of intervertebral disk. Experimental observations on human autopsy specimens. *Clin Orthop* 1991; 267: 245-50.
9. **Choy D, Ascher P, Saddekni S, Alkaitis D, Liebler W, Hughes J.** Percutaneous laser disc decompression. A new therapeutic modality. *Spine* 1992; 17: 949-56.
10. **Gropper G, Roberston J, McClellan G.** Comparative histological and radiographic effect of CO2 laser versus standard surgical anterior cervical discectomy in the dog. *Neurosurgery* 1984; 14: 42-7.
11. **Yonezawa T, Onomura T, Kosaka R, Miyaji Y, Tanaka S, Watanabe H.** The system and procedures of percutaneous intradiscal laser nucleotomy. *Spine* 1990; 15: 1175-85.
12. **Guillen P.** Arthroscopic laser surgery in treating the knee injuries of leading professional athletes. *Am J Arthroscopy* 1991; 9: 15-8.
13. **Guillen P.** Cirugía artroscópica de rodilla con láser Holmium. *Rev Orthop Traum* 1992; 36-IB Supl I: 15-8.
14. **Fanton G, Dillingham M.** The use of the Holmium: YAG Laser in arthroscopic surgery. *Sem Orthop* 1992; 7: 102-16.
15. **O'Brien S, Fealy S, Miller D.** Nd: YAG contact laser arthroscopic. *Sem Orthop* 1992; 7: 117-24.
16. **Smith C, Johansen W, Vangness C, Marshall G, Sutter L, Bonavolet T.** Gas bubble technique in arthroscopic surgery. *Sem Orthop* 1992; 7: 86-9.
17. **Whipple T, Caspari R, Meyers J.** Arthroscopic laser meniscectomy in a gas medium. *Arthroscopy* 1985; 1: 2-7.
18. **Metcalf R, Dixon J.** Use of lasers for arthroscopic meniscectomy. A preliminary report on laboratory investigations. *Lasers Surg Med* 1984; 3: 305-9.
19. **Booth R, Gordon S, Carney M.** Use of the CO2 laser in revision hip surgery. *Contemp Orthop* 1987; 15: 17-22.
20. **Sherk H, Kollmer C.** Lasers in Orthopedics. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1990.
21. **Asensio Arana F.** Estudio de la cicatrización de las anastomosis en el colon de la rata tras la irradiación con luz láser de 632, 8 nm. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 1986.
22. **Almquist E, Nachemson A, Auth D, Almquist B, Hall S.** Evaluation of the use of the argon laser in repairing rat and primate nerves. *J Hand Surg* 1984; 9-A: 792-9.
23. **Anders J, Borke R, Woolery S, Van de Merwe W.** Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the facial nerve. *Lasers Surg Med* 1993; 113: 72-82.
24. **Campion E, Bynum D, Powers S.** Repair of peripheral nerves with the argon laser. A functional and histological evaluation. *J Bone Joint Surg* 1990; 72-A: 715-23.
25. **Almquist E.** Nerve repair by laser. *Orthop Clin North Am* 1988; 19: 201-8.
26. **Garces G, Bradley J.** Relationship between growth plate height and bone length. *Med Sci Res* 1988; 16: 679-81.
27. **Seinsheimer F, Sledge C.** Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J Bone Joint Surg* 1981; 63-A: 627-31.
28. **Garces G, García J, Guerado E, Bradley J.** Medición de la altura fisaria y sus capas: influencia del error de observación. *Rev Orthop Traum* 1990; 34-IB: 316-8.
29. **Dung H.** Electron microscopic study of involution thymus of lethargic mutant mice. *Anat Rec* 1973; 177: 585-9.
30. **Abergel R, Lam T, Lask G, Dwyer R, Castell J, Vitto J.** Efectos biológicos del láser. *Invest Clin Laser* 1986; 1: 7-14.
31. **O'Brien S, Miller D.** The contact neodymium-yttrium aluminum garnet laser: a new approach to arthroscopic laser surgery. *Clin Orthop* 1990; 252: 95-100.
32. **Cañadell J.** Lesiones del cartílago de crecimiento. Salvat S.A., Barcelona, 1988.
33. **Barr J, Lingley J, Gall E.** The effect of roentgen irradiation on epiphyseal growth. Experimental studies upon the albino rat. *AJR* 1943; 49: 104-9.
34. **Argüelles F, García A, Gomar F, Esquerdo J.** Estudio experimental sobre los efectos de la radiación gamma en el cartílago articular y fisario en crecimiento. *Rev Orthop Traum* 1975; 10-IB: 1-8.
35. **Miro L, Deltour G, Bruel M.** Estudio capilaroscópico de la acción del láser AsGa sobre la microcirculación. *Inves Clin Laser* 1985; 4: 114-9.
36. **Pérez Casas A, Alvarez A, Bengoechea M.** Alteraciones estructurales, histoquímicas e histoenzimológicas, producidas por los ultrasonidos sobre el cartílago de crecimiento de la rodilla del cobaya. *Rev Orthop Traum* 1981; 25-IB: 471-80.