



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
UNIDAD PROFESIONAL ADOLFO LOPEZ MATEOS

ACELERACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA
FRACTURA ÓSEA EMPLEANDO LÁSER

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
INGENIERÍA MECÁNICA

PRESENTA

M.C. PEDRO ALEJANDRO LOMELÍ MEJÍA

DIRECTOR: Dr. GUILLERMO URRIOLAGOITIA CALDERÓN





CGPI-14

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de Agosto del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. S. I. M. E. para examinar la tesis de grado titulada:

“ACELERACIÓN DEL PROCESO DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA FRACTURA OSEA EMPLEANDO LASER”

Presentada por el alumno:

LOMELÍ

MEJÍA

PEDRO ALEJANDRO

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro:

B	9	9	1	1	8	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

DR. GUILLERMO URRIOLAGOITIA CALDERON

DR. ALEXANDER BALANKIN

DR. JOSÉ LUIS JIMÉNEZ PÉREZ

DR. VÍCTOR MANUEL DOMÍNGUEZ

DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ GÓMEZ

DR. ORLANDO SUSARREY HUERTA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FLORENCIO SÁNCHEZ SILVA






INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA SESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, Distrito Federal, el día 29 del mes SEPTIEMBRE del año 2004, el (la) que suscribe PEDRO ALEJANDRO LOMELÍ MEJÍA alumno(a) del Programa de DOCTORADO EN INGENIERÍA MECÁNICA OPCIÓN DISEÑO con número de registro 991187, adscrito a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESIME Unidad Zacatenco, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente Trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. GUILLERMO URRIOLAGOITIA CALDERÓN y cede los derechos del trabajo intitulado: ESTIMULACIÓN DEL PROCESO DE LA CONSOLIDACIÓN ÓSEA EMPLEANDO LÁSER, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, graficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: AV. Chilpancingo # 62 Edificio E-102, Valle Ceylan, Edo. México. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Pedro Alejandro Lomeli Mejia
Nombre y firma

TESIS DOCTORAL

**ACELERACIÓN DE LA
CONSOLIDACIÓN DE LA FRACTURA
ÓSEA EMPLEANDO LÁSER**

M.C. PEDRO ALEJANDRO LOMELÍ MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. GUILLERO URRIOLAGOITÍA CALDERÓN

A DIOS

A MIS HIJOS:

VALENTINA Y GUILLERMO

Deseo que mis hijos vean en estas páginas el resultado de mucho trabajo y dedicación y los motive para tener cada día nuevas y mejores metas. Pero que su objetivo principal en la vida sea estar en paz con Dios y servir a sus semejantes en la medida de sus capacidades.

Gracias a Dios por todo lo que él me ha dado: mis padres:

María de Jesús y Pedro

mi esposa ***Lupita***

mis hijos ***Valentina y Guillermo***

mi hermana ***Eugenia***

Pero sobre todo por la vida y el amor que me ha dado siempre.

Sinceramente estoy agradecido con el Dr. Guillermo Urriolagoitia Calderón ya que él confió en mí, y me dio la oportunidad de ingresar al plan de estudios de doctorado de la Sección de Posgrado e Investigación de la ESIME-Zacatenco.

Agradezco el apoyo económico que me brindo el CONACYT

Un gran cariño y agradecimiento tengo al Centro Nacional de Rehabilitación y sus autoridades, que me brindaron siempre la oportunidad de continuar con mi trabajo de investigación.

Estoy convencido ahora que termino este trabajo que las grandes metas, son en algunos casos el resultado de muchos esfuerzos dirigidos para alcanzar un objetivo. Este trabajo de investigación no es la excepción y como un acto de gratitud mencionaré a las personas que de alguna forma tomaron parte en su desarrollo. Todos son importantes para mí. Si por alguna causa he omitido el nombre de un colaborador, pido de antemano me disculpe. No fue mi intención, más bien causa de mi mala memoria.

Ahora deseo mencionar a quienes con su sacrificio, hacen posible el desarrollo de la investigación básica, en muchos campos de la ciencia. Me refiero a las ratitas Wistar. Todas ellas dieron su vida para que yo logre un objetivo y no serán olvidadas. Fueron proporcionadas por donación, en los bioterios del Instituto de Psiquiatría, por el M.V.Z. Mario Aguilar y del Instituto de Perinatología, por la M.V.Z. Susana González Gallardo.

El modelo experimental para reproducir el trazo de la fractura en ratas adultas, así como sus cuidados, se llevó a cabo en el bioterio del Centro Nacional de Rehabilitación, gracias a la asesoría del M.V.Z. Hugo Lecona Butrón, jefe de este servicio y de su esposa la Dra. Maria Elena Contreras Figueroa. De igual manera deseo mencionar que el Dr. Hugo Lecona facilitó su equipo de análisis bioquímico para llevar a cabo la determinación de fosfatasa..

Para cada etapa de la consolidación, se llevó a cabo una serie de ratas que se fracturaron y a las cuales se les brindó el mismo cuidado, respeto y cariño. Para ello conté no sólo con el apoyo de Hugo y su esposa, también de alguno de sus ayudantes. Enseguida menciono a todos aquellos con quién tuve la oportunidad de colaborar en este servicio.

Felipe Valdez Rubio
Gustavo Alatorre Mata
Jesús Miguel Osorio Camacho
Jorge De la Fuente Sánchez
Juan Martín Ramírez Gómez
Julio Cesar Suárez Alcázar
Marisela Granados Oliva
Miriam Edith Amaro Lara
Pablo Esparza Pineda
Ricardo Mejenes López

No tengo palabras para agradecer todo lo que para mi ha significado el apoyo que la Dra. Hilda Villegas Castrejón, me ha brindado. Así como las doctoras Maria Rosario Neri Basurto y Lilia Solís de su servicio.

Gracias Dr Víctor Manuel Domínguez Hernández, jefe del servicio de biomecánica, por tu paciencia, tu orientación y apoyo en muchas etapas del desarrollo, pero sobre todo por ser mi amigo.

Después de hacer una revisión bibliográfica, encontré con gran satisfacción que no se han publicado estudios fotoacústicos, del proceso de la consolidación ósea. De esta forma al tratar de conocer como cambia el índice de absorción del callo en el trazo de la fractura, podemos decir que somos pioneros en este tipo de aplicaciones ópticas. Este objetivo pudo cumplirse gracias a la asesoría de los doctores Alfredo Cruz Orea, jefe del servicio de Fotoacústica del Departamento de Física del CINVESTAV y José Luis Jiménez Pérez, del Departamento de Posgrado de CICATA Legaría. Gracias a la colaboración con ellos fue posible presentar este trabajo en Badajoz, España y en Brasil. Sin lugar a dudas es tan sólo el inicio de muchas experiencias que vamos a compartir en el campo de la investigación.

Para el diseño y construcción del equipo láser, conté con la colaboración de dos amigos: el M.C. Arturo Rangel Merino y el M.C. Alejandro Flores. Sinceramente hubiera sido muy difícil alcanzar este objetivo, sin su valiosa colaboración. Recuerdo los días que pasamos juntos analizando, cada etapa del proyecto. Los aciertos y errores cometidos, que en muchas ocasiones fueron míos. Gracias por su paciencia, aprendí mucho de ustedes.

Gracias a la Dra. María Susana Reyes Cadena, al Dr. Rene Telles Gastellum y al Dr. . Cuitlahuac Rigoberto Cerón Orta, por orientarme siempre que lo solicite.

Gracias al servicio de informática por su valiosa asesoría, siempre que la solicite, a todos gracias.

ACELERACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA FRACTURA ÓSEA EMPLEANDO LÁSER



ÍNDICE GENERAL

**RESUMEN
ABSTRACT
OBJETIVO
JUSTIFICACIÓN
INDICE TEMÁTICO
INDICE DE FIGURAS
INDICE DE TABLAS
GLOSARIO
SIMBOLOGÍA**

RESUMEN

El láser ha tomado gran importancia debido a sus múltiples aplicaciones. En la medicina no es la excepción, en este trabajo se presenta la aplicación del láser, para estimular el proceso de la consolidación ósea, en personas que tienen una lenta respuesta osteogénica. Ya sea por problemas degenerativos debidos a la edad, metabólicos o de otro tipo.

Otro grupo de interés que también motivó a esta investigación, es el de los deportistas de alto rendimiento, ya que aún cuando se trata de personas jóvenes, se tiene por diversas razones la necesidad de incorporarlos a su actividad, tan pronto como sea posible.

Como una respuesta a estas inquietudes, se presenta aquí, un análisis para conocer los mecanismos probables por los cuales es posible la estimulación con láser. Posteriormente se muestra el desarrollo de un estimulador, para acelerar el proceso de la consolidación ósea. Este equipo tiene la posibilidad de trabajar tanto en forma continua como en forma pulsada. En esta investigación solamente se aplicó radiación láser en forma continúa, a un modelo en ratas Wistar.

Se hicieron análisis biomecánico, de microscopía electrónica de barrido ambiental, bioquímico y foto acústicos. Al hacer análisis foto acústico, se da una aportación al análisis biomecánico tradicional, ya que es posible entender que existe una relación entre propiedades mecánicas y ópticas en la formación del callo óseo.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de microscopía electrónica, se trabajó en el desarrollo de un modelo que sirve para predecir la distribución de elementos que contribuyen a la consolidación de la fractura ósea, para este modelo animal.

Posteriormente se presentan las conclusiones y sugerencias para trabajos futuros.

ABSTRACT

The laser has taken great importance due to its multiple applications. Medicine is not the exception. In this work the application of the laser, in order to stimulate the process of the bony consolidation is presented, in patients with have a slow osteogenic response. Such as degenerative problems caused by age, metabolism or others.

Another group of interest that was also a reason for this investigation, is the one of the high performance athletes , since, this group is formed by young people, there is the necessity to incorporate them to its activity, as soon as possible.

As an answer to these questios, an analysis to know the probable mechanisms involved in laser stimulation is presented. Then development of a estimator, to accelerate the process of the bony consolidation. Is shown this equipment has the possibility of either working in a continuous form, or in a one. In this research work, laser radiation was applied only in continuous form, to a Wistar rats model in.

Biomechanical analysis, scanning electronic microscopy, biochemical and photoacoustic analysis were performed. Photoacoustic analysis is a contribution to the traditional biomechanical analysis, since it is possible to study the relation ship between mechanical and optical properties involved in callus formation.

Based upon the results obtained in the scanning electronic microscopy, we further work on the development of a model that serves to predict the distribution of elements that contribute to the consolidation of the bony fracture, using previously mentioned rat model.

The conclusions and suggestions for future works are presented.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que es posible estimular la consolidación ósea, al aplicar radiación láser, de baja potencia y establecer un modelo matemático, que permita conocer la distribución de elementos que se pueden conocer en la formación del callo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Hacer Estudios de biomecánica, fotoacústica, microscopia electrónica, histología y bioquímica, para conocer la evolución de la consolidación de la fractura, de la manera más amplia posible.

Establecer relaciones entre variables medibles, en los distintos análisis., para ambos grupos de estudio: control y experimental.

Demostrar que los aspectos ópticos y los diferentes estadios de la consolidación se pueden relacionar.

JUSTIFICACIÓN

Hay pocos trabajos que relacionen la importancia de correlacionar propiedades mecánicas y ópticas, de los tejidos. Más aún que traten el problema de establecer un modelo que explique la relación que existe entre parámetros ópticos y los distintos estadios de la consolidación ósea, en una fractura no patológica y de un sólo trazo. O bien que correlacionen parámetros de distintos estudios como pueden ser histológicos, bioquímicos, o de microscopía electrónica, con el avance de la osteogénesis.

La importancia de tener un modelo como el que se pretende encontrar es, que de esta forma será posible diseñar equipos para el diagnóstico de fracturas, y dar alternativas para conocer el avance de la consolidación ósea.

Diseñar y construir un estimulador láser que permita la estimulación de la consolidación ósea, esto servirá par iniciar una línea de investigación básica, en el tratamiento de fracturas óseas, y de estimulación de cicatrización de piel. También puede ser útil en el tratamiento de problemas de túnel de carpo, y de tendón de Aquiles. Que son muy frecuentes en deportistas. Esto es posible ya que aún cuando se trabaja con un modelo en ratas, el dispositivo esta diseñado para que se pueda usar posteriormente en aplicaciones en humanos.

ÍNDICE TEMÁTICO

	Pág.
CAPITULO 1 BIOMECAÁNICA	1
1.1 Estructuras del hueso	2
1.1.1 Nivel macroscopico	3
1.1.2 Nivel microscópico	4
1.1.3 Nivel submicroscópico	6
1.1.4 Nivel de la nanoestructura	6
1.1.5 Subnanoestructura	7
1.2 Diferenciación celular	7
1.3 Biomecánica del hueso	8
1.3.1 Hueso cortical	9
1.3.1.1 Efectos de la edad	11
1.3.1.2 Micro estructura y propiedades mecánicas.	11
1.3.2 Hueso trabecular	12
1.3.2.1 Efectos de la edad	13
1.4 La fractura ósea	14
1.5 Mecanismos de reparación del hueso	15
1.6 Causas del retardo en la consolidación ósea	19
1.7 Planteamiento del problema e hipótesis	19
1.8 Metodología	20
1.8.2 Resultados esperados	21
Referencias	22
CAPÍTULO 2 ESTUDIOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DEL CALLO ÓSEO	24
2.1 Biomecánico	25
2.2 Fotoacústico	27
2.3 Histológico	35
2.4 Microscopía electrónica	37
Resumen	41
Referencias	42
CAPÍTULO 3 LA LUZ EN LOS TEJIDOS E INTRODUCCIÓN A LOS LASERES.	43
3.1 Propiedades ópticas de los tejidos	44
3.2 Interacción de la luz en los tejidos.	51
3.3 Mecanismos de interacción de la luz con las células en el proceso de la consolidación ósea.	56
3.4 Introducción a los laseres	60
Resumen	64
Referencias	65
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA	67
4.1 Determinación del número mínimo de animales que han de emplearse	68

	y selección de las ratas Wistar.	
41.1	Selección de las ratas Wistar.	69
4.2	Determinación de la longitud de onda, dosis y tiempo de aplicación del láser.	69
4.3	Desarrollo experimental.	71
4.3.1.1	Procedimiento	72
4.3.2	Estudios para la evaluación del avance de la fractura.	74
4.3.2.1	Estudios de microscopia electrónica de barrido ambiental.	75
4.3.2.2	Estudio biomecánico	76
4.3.2.3	Estudio histológico	77
4.3.2.4	Estudio fotoacústico	77
4.4	Justificación de la elección del láser	79
	Referencias	80
	CAPÍTULO 5 DISEÑO DEL ESTIMULADOR LÁSER	81
	CAPÍTULO 6 RESULTADOS	93
	CAÍTULO 7 MODELOS DEL INCREMENTO DEL CALLO ÓSEO	106
	APÉNDICE	117

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág
1.1	Estructura jerárquica de la formación de los huesos.	2
1.2	Estructura microscópica del hueso.	3
1.3	Corte de un hueso cortical con sus estructuras internas.	5
1.4	Osteoclastos antes y después de ser polarizados	6
1.5	Fenotipos de células tallo mesenquimatoso	8
1.6	Gráfica esfuerzo-deformación para hueso cortical.	10
1.7	Espesor de trabeculas en columna como función de la fracción de volumen de hueso.	13
1.8	Formas más comunes de fracturas óseas.	15
1.9	Etapas de la consolidación de la fractura ósea.	16
2.1	Viga sometida a flexión a tres puntos	25
2.2	Distribución de momentos de la viga sometida a flexión a tres puntos	26
2.3	Modelo del efecto fotoacústico	27
2.4	Generación de la señal foto acústica.	34
2.5	Arreglo experimental fotoacústico	34
2.6	Microscopio electrónico	37
2.7	Diagrama a bloques del microscopio electrónico	39
3.1	Coefficientes de absorción de los tejidos	45
3.2	Espectro de absorción del agua	45
3.3	Espectro de absorción de la hemoglobina	46
3.4	Estructuras de la piel humana	47
3.5	Onda electromagnética, en el plano cartesiano	51
3.6	Espectro electromagnético	52
3.7	Diagrama intensidad-potencia	57
4.1	Detalles para rasurar las ratas	72
4.2	Detalles anatómicos del abordaje	73
4.3	Forma de efectuar la fractura	73
4.4	Sutura por planos	74
4.5	Forma de hacer estudios biomecánicos	77
4.6	Espectro de absorción óptica de la rata Wistar	79
5.1	Diagrama a bloques del estimulador	83
5.2	Fuente de alimentación del circuito	83
5.3	Circuito Driver	85
5.4	Circuito sensor de la radiación láser.	86
5.5	Circuito oscilador	88
5.6	Detalles del circuito impreso	89
5.7	Circuito impreso respaldo componentes	89

5.8	Curvas de respuesta del diodo láser	90
5.9	Curvas de respuesta del diodo láser	90
5.10	Circuito de control ensamblado.	91
6.1	Gráfica desplazamiento-carga, para los días 21 y 28	95
6.2	Gráfica desplazamiento-carga, para el día 35	95
6.3	Espectro de absorción de la consolidación ósea.	97
6.4	Distribución de enzimas y proteínas como función del tiempo.	97
6.5	Microfotografía correspondiente al día 6, después de la fractura	
6.6	Microfotografía correspondiente al día 24, después de la fractura	
6.7	Microfotografía correspondiente al día 35, después de la fractura	
6.8	Distribución de elementos en el trazo de la fractura, durante la formación del callo óseo.	
6.9	Distribución de calcio y fósforo en el trazo de la fractura, durante la formación del callo óseo.	

TABLAS

Tabla No	Descripción	Pág.
1.1	Densidades características de fémur y tibia, en humanos	10
1.2	Esfuerzos comparativos, que soporta el hueso.	11
2.1	Concentración de alcohol para el proceso de deshidratación	36
3.1	Coefficientes De absorción y dispersión de hueso trabecular	50
7.1	Elementos encontrados en la formación del callo, por análisis de microscopia electrónica	133
7.2	Distribución de la fosfatasa alcalina-grupo control	135
7.3	Distribución de la fosfatasa alcalina-grupo experimental	136

GLOSARIO

Alambre Kirchner: Alambre de acero inoxidable, para aplicaciones ortopédicas. En este trabajo su función es la de un clavo centromedular.

Ácido urocánico: Sustancia que produce la piel de forma natural para protegerse contra el sol.

Bases de ADN: Estructuras moleculares, que constituyen las cadenas del ADN. Son la adenina, guanina, citosina y timina. De su disposición espacial en las cadenas, depende la información genética.

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico basófilo: Es una proteína que estimula el incremento de fibroblastos.

Citoplasma: Es un medio acuoso donde se encuentran suspendidos los constituyentes celulares.

Colágena: Es una proteína fibrosa, soluble en agua, que constituye, aproximadamente el 35 % del tejido conectivo, en un hueso sano. Los espacios restantes, de la matriz ósea son llenados por compuestos ricos en fósforo, calcio, y otros minerales.

Canales de Havers: Son estructuras de hueso laminar, dispuestas en forma concéntrica alrededor de unos conductos paralelos al eje longitudinal del hueso, contienen tejido nervioso y vasos sanguíneos que proporcionan a los huesos nutrientes orgánicos.

Canales de Volkman: Son ductos que unen las fibras de colágeno transversalmente con el canal medular y con el exterior.

Células pluripotenciales: Son células no diferenciadas, capaces de dar origen a los más diversos tejidos. Se les llama pluripotenciales, porque guardan en sí mismas las múltiples características de todas las demás células las cuales, posteriormente se transforman en células hepáticas, células nerviosas, musculares, etc.

Citocinas: Son moléculas solubles, secretadas por diferentes tipos de células, en respuesta a algún tipo de estímulo, tales como: virus, hongos, bacterias, etc.

Pueden alterar su propia función o la de otras células, constituyen un grupo variado entre las cuales están incluidas las linfocinas, factores de crecimiento tumoral, factores de transferencia, factores de crecimiento celular y prostaglandinas, sólo por citar algunas.

Ejercen un papel fundamental, en la regulación del tipo y magnitud de la respuesta inmune del organismo.

Citocrome c oxidasa (CcO): Es la enzima terminal en la cadena respiratoria células eucarióticas y la mayoría de las bacterias. Es localizada en el interior de la membrana de la

mitocondria y la membrana celular de las prokarioticas, donde reduce el oxigeno molecular a agua, acopla la reaccion de REDOX y la bomba de protones que cruza la membrana.

Citoplasma:

Citocromo: Enzimas que se ubican principalmente en el higado. Sus funciones principales son:

- Eliminación de sustancias exógenas, es decir, sustancias que no son sintetizadas en el propio organismo.
- Degradación de sustancias del propio organismo. Como ejemplos de éstos: esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles (A y D), alcaloides endógenos, etc.
- Síntesis de óxido nítrico gaseoso simple, usado, entre otras funciones, como toxina antipatógeno.

Diáfisis: Es la parte central más larga, de los huesos, y está constituida por hueso compacto.

Endosito: Es una membrana fibrosa vascular, que cubre al hueso, por la superficie interna de su canal medular.

Enzimas proteolíticas: Proteínas naturales que tienen como función degradar colágena y cartilago.

Epífisis: Es la zona localizada en la parte superior de la fisis o zona de crecimiento de los huesos.

Espículas: Son las estructuras del hueso esponjoso, o trabecular.

Esterioradianes: Ángulo sólido con su vértice en el centro de una esfera de radio r , el cual es subtendido por un área de superficie esférica igual a la de un cuadrado con lado de longitud r . En una esfera cerrada, hay 4π esterioradianes.

Fibrina: Proteína que actúa en el proceso de la coagulación, proporciona su carácter semisólido al coágulo sanguíneo. La estabilización de esta fibrina se realiza por el factor activo XIIIa.

Fibrosis: Aumento patológico del tejido conjuntivo en algún órgano o tejido. Aunque puede producirse por múltiples enfermedades, la mayoría de las veces es la respuesta cicatricial normal a una lesión o a una herida quirúrgica.

Fosfatasa: Son dos tipos de proteínas alcalina y ácida. La fosfatasa alcalina es sintetizada en un tipo de osteoblastos, sus fuentes principales son el higado, hueso, intestino, placenta y riñón y está relacionada con enfermedades óseas y hepatobiliares. Es posible observar un incremento durante las primeras etapas de la consolidación ósea. Por otro lado, las fuentes principales de la fosfatasa ácida son la próstata y los eritrocitos y está relacionada con el carcinoma de próstata.

Glutaraldeido: Es un fijador que sirve para preparar muestras de tejidos biológicos y

posteriormente observarlas al microscopio electrónico.

In vitro: Estudio que se hace en el laboratorio, simulando condiciones reales, del espécimen que se desea estudiar.

In vivo: Estudio que se hace generalmente con animales de laboratorio, en condiciones reales.

Lísis: Degradación del tejido óseo.

Macrófagos: Células especializadas en la defensa del organismo, su mecanismo de defensa se basa en el hecho de que envuelven y destruyen a todo elemento que consideren invasor.

Material resiliente: Que sea resiliente un material significa que tiene la capacidad de absorber energía, en forma considerable, antes de la fractura.

Melanina: Palabra derivada del griego “melas”, significa negro. Es un pigmento producido exclusivamente por células especializadas llamadas melanocitos, localizadas en la superficie de la piel. Es un filtro que difracta la radiación solar impidiendo que penetren en el cuerpo longitudes de onda, en el espectro ultravioleta. El hecho de que la piel se broncee como consecuencia de los rayos solares constituye una reacción defensiva de la piel y evita que se quemé y se dañen los núcleos celulares

La cantidad de melanina que se forma en la piel depende en gran medida de la exposición al sol.

Metáfisis: Es la zona localizada en la parte superior de la fisis, en los huesos, principalmente largos.

Mezenquima: Células que están presentes en la etapa embrionaria y tienen la capacidad de diferenciarse a casi cualquier tipo de tejido.

Miositis: **Monocitos**: Los monocitos y los macrófagos son miembros del sistema fagocítico mononuclear. Su función principal es participar en la inflamación y defensa del organismo (capacidad de reaccionar ante elementos que le son propios y extraños). Son células de 12 a 20 μm , con abundante citoplasma que contiene orgánulos necesarios para sintetizar proteínas secretoras y de membrana.

Mucopolisacaridos: Forman parte del tejido conjuntivo. Su biosíntesis es estimulada por los andrógenos y la hormona del crecimiento e inhibida por los glucocorticoides.

Neoplasia: Proceso tumoral.

Operación a foco cerrado: Es una operación en la cual, se procura hacer una mínima incisión.

Organelos: Son los constituyentes de la célula y están suspendidos en el citoplasma.

Osteon: Unidad elemental básica de la estructura ósea.

Pelets: Es un tipo de alimento para animales de laboratorio.

Péptidos: La unión de aminoácidos (AA) mediante enlaces amida origina los péptidos. En los péptidos y en las proteínas, estos enlaces amida reciben el nombre de enlaces peptídicos y son el resultado de la reacción del grupo carboxilo de un AA con el grupo amino de otro, con eliminación de una molécula de agua.

Cuando el número de AA está comprendido entre 10 y 100 se trata de un polipéptido y si el número de AA es mayor de 100, se habla de proteínas.

Periostio: Es una membrana fibrosa vascular, que cubre al hueso, por su parte externa.

Perfusión sanguínea: Aporte o circulación sanguínea, bien sea natural o artificial a un órgano.

Preosteoblastos: Son células de aspecto fibroblástico cercanas a las superficies óseas pero separadas de estas por otros tipos celulares (células del endostio, osteoblastos). Los preosteoblastos derivan de una célula madre del estroma medular (CFU-F: Unidad Formadora de Colonias de Fibroblastos) y en condiciones normales constituyen el compartimiento proliferativo del linaje osteoblástico.

Reología de la sangre: Es el estudio de la sangre, y se considera un fluido no newtoniano.

Proteína morfogenética (BMPs): Es el nombre genérico de una familia de proteínas, identificadas originalmente en extractos de hueso desmineralizado, que son capaces de inducir la formación de hueso en sitios ectopicos (lugares donde no se esperaba la formación ósea). BMPs son encontradas en cantidades mínimas en la estructura ósea (aproximadamente 1µg/kg de peso de hueso seco).

Qx: Es una forma común de indicar una intervención quirúrgica.

Redox: Es una forma abreviada de mencionar los mecanismos de oxidación y reducción, que suceden en la frontera de la membrana de la mitocondria, por la acción de algunos estímulos.

Rx: Es una forma común de indicar un estudio de rayos X

Tensión: En patología se emplea este término al referirse a aplicar un pigmento a los tejidos que se desean observar al microscopio.

Vacutainer: Tubo al alto vacío, estéril que se usa para tomar muestras de sangre en pacientes humanos.

SIMBOLOGÍA

- a = Albedo
- $d\omega$ = Ángulo diferencial del sólido en la dirección \hat{s} .
- θ = Ángulo de incidencia
- g = Coseno del ángulo promedio
- μ_a = Coeficiente de absorción
- μ_s = Coeficiente de dispersión
- R = Coeficiente de reflexión de Fresnel
- S = Dirección s
- $E_{1,2}$ = Energía con niveles 1 ó 2
- h = Constante de Plank
- ν_{21} = Frecuencia correspondiente a los niveles 1 y 2
- I = Intensidad de la luz incidente
- I_o = Intensidad de la luz transmitida
- n = Índice de refracción del tejido donde incide la luz.
- ρ = Densidad de la partícula
- σ_a = Sección transversal de la zona de absorción de la radiación.

CAPÍTULO 1



BIOMECÁNICA

Se analiza el comportamiento biomecánico y fisiología del hueso y se hace énfasis en los mecanismos que dan lugar a la fractura y su clasificación, así como la forma en que se remodela el hueso.

CAPÍTULO 1

BIOMECÁNICA

Para hablar de la biomecánica es preciso primero tener clara su definición. Bio es un sufijo de origen griego que significa vida y mecánica es el estudio de los movimientos de los objetos y de las fuerzas que afectan a dichos movimientos. Por lo que biomecánica es el estudio de los efectos de las fuerzas mecánicas en los organismos vivos.

1.1 Estructuras del hueso [1, 2, 3]

El hueso es un tejido constituido tanto por una parte orgánica, como por una base mineral que le proporciona importantes propiedades mecánicas.

Para entender la estructura del hueso, es posible imaginar como es este tejido al ser observado a través del microscopio y poco a poco, a medida que aumenta la amplificación, conocer los elementos que lo constituyen y su relación entre ellos. Así, vemos una organización estructural que está determinada como se muestra en la figura 1.1

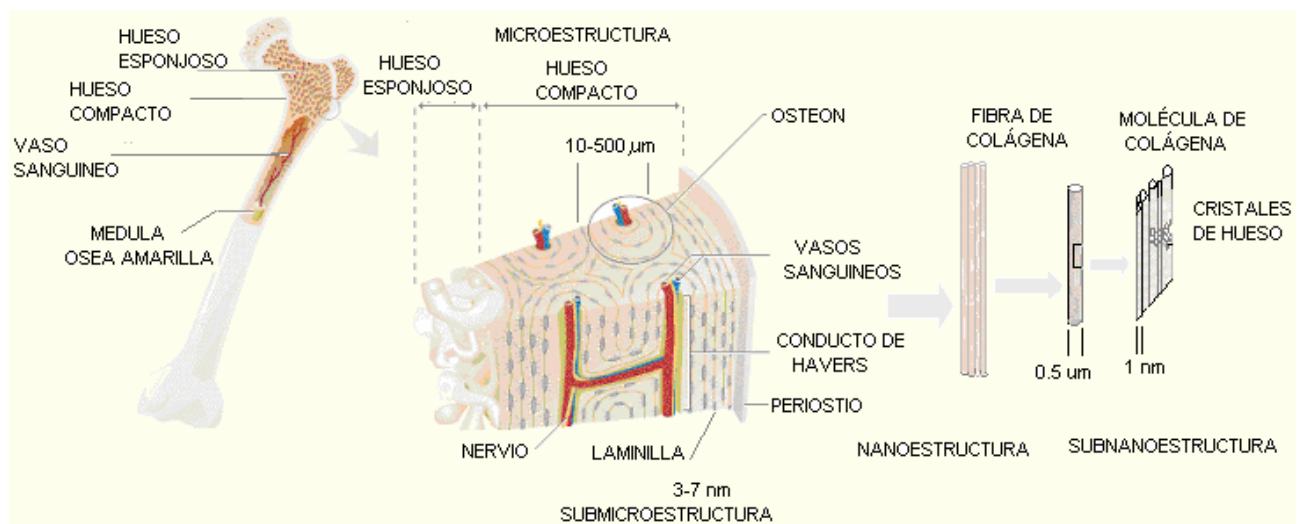


Figura 1.1 Estructura jerárquica de la formación de los huesos. [1]

1.1.1.- Nivel macroscópico.

Se observan dos tipos de hueso: cortical y esponjoso como se muestra en la figura 1.2. Aunque ambos tipos de hueso, cortical y esponjoso, se distinguen a simple vista por su

porosidad o densidad, la verdadera diferenciación es el resultado de un estudio histológico.

El hueso cortical o compacto aparece como una pieza sólida, formada por cilindros de hueso laminar maduro. Es encontrado en la envoltura de huesos cuboides y constituye la diáfisis de huesos largos, sujetos a fuerzas tanto de compresión como de torsión, así como de flexión. Se nutre a través de una membrana exterior, llamada periostio y del canal medular por el endostio, que tiene la función de nutrir al hueso directamente desde la médula ósea.

El hueso esponjoso es más activo que el hueso cortical, en el sentido de que se remodela más frecuentemente, por lo que es un hueso joven. No contiene canales de Havers, consiste en un entramado de trabéculas o laminillas óseas que se disponen de forma tridimensional, creando cavidades comunicadas entre sí. De esta forma, los nutrientes pueden ser recibidos a través del periostio, desde diversas direcciones. Esos espacios están llenos de médula ósea y osteocitos.

El hueso trabecular y el laminar, son estructuras que evolucionan a hueso esponjoso y cortical respectivamente. La densidad del hueso cortical es aproximadamente cuatro veces la del hueso esponjoso. Se localizan principalmente en animales jóvenes, tanto en sus primeras etapas de vida, como en el sitio de la fractura, así como en la metafisis y epífisis de huesos largos y en huesos cuboides, tales como las vértebras. Las trabéculas se dirigen con respecto a las líneas de esfuerzos principales de los huesos y forman una estructura tridimensional.

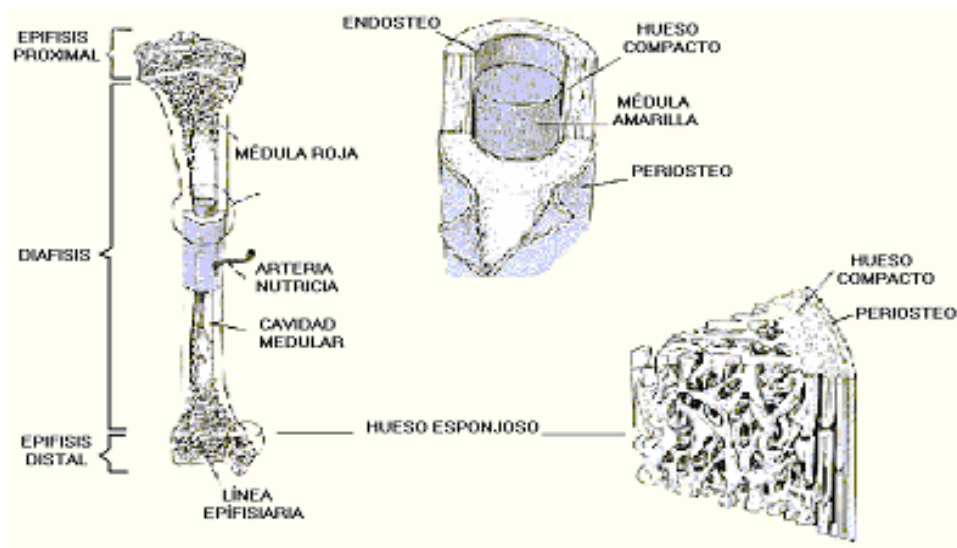


Figura 1.2 Estructura microscópica del hueso. [4]

1.1.2- Nivel microscópico (de 10 a 500 μm).

A este nivel se observa el sistema Haversiano, los osteones y trabéculas. El osteon o sistema Haversiano tiene un diámetro aproximado de 200 a 500 μm , es la unidad más compleja de

hueso cortical. Está constituida por un canal (canal Haversiano), el cual contiene nervios y vasos sanguíneos, rodeado por capas de fibras de colágeno, de un espesor aproximado de 3 a 7 μm , en forma de anillos circulares de hueso laminar. La membrana de los vasos permite limitar el paso en forma selectiva de todos los materiales que atraviesan su pared. Es de particular importancia en el transporte de iones de calcio y fósforo, también en la respuesta del hueso a cargas mecánicas.

El hueso trabecular está constituido por fibras de colágeno mineralizado, con una orientación no uniforme. Tiene más celdas por unidad de volumen que el hueso laminar, su contenido mineral varía y sus celdas, aleatoriamente distribuidas, le dan su característica isotrópica. Cada fibra de colágeno es del orden de 0.5 μm y están orientadas a lo largo del eje del hueso y son conectadas entre sí con las cavidades medulares y con el exterior por los canales de Volkman.

Los huesos, a diferencia de otras estructuras orgánicas, se remodelan continuamente gracias a dos tipos de células, los osteoblastos y los osteoclastos, así como por la acción de las hormonas y aún más por el sistema inmune, lo que hace del tejido óseo un sistema complejo e interesante.

Los osteoblastos y los osteocitos son los encargados de la regeneración del hueso. La principal diferencia en esas células es su localización. Los osteoblastos son células grandes localizadas en la superficie del hueso por debajo del periostio. Contribuyen a la regeneración ósea al depositar sales de calcio, que ellos mismos atraen del torrente sanguíneo. Su dinámica responde a la actividad de la hormona paratiroides, y producen osteocalcina, cuando son estimulados por la vitamina D. Una vez que un osteoblasto es rodeado por una matriz ósea, la célula se caracteriza por una alta razón del citoplasma al núcleo y contiene sólo algunos organelos. A esta nueva estructura celular se le conoce como osteocito. De esta forma los osteocitos constituyen la mayor cantidad de células óseas y están dispuestas en forma concéntrica con respecto al osteón, en capas de hueso laminar. Están orientados a lo largo de las laminillas, paralelos al eje del hueso.

La actividad metabólica de los osteocitos no es totalmente conocida, sin embargo se sabe que su distribución tridimensional y su interconexión en el proceso celular indica que ellos están perfectamente organizados, de tal forma que permiten la transmisión de esfuerzos y deformaciones (son sensores mecánicos), además regulan de forma significativa el proceso metabólico del tejido. Los osteoblastos normales producen hueso, bajo una variedad de condiciones, incluyendo desarrollo embrionario, crecimiento óseo, remodelación, osificación de miositis, osificación heterótópica seguida de trauma en el tejido blando o fractura y en respuesta a neoplasia e infecciones. A pesar de esas condiciones aparentes, el proceso de formación de hueso es el mismo. Puede primero ser reconocido cuando las células especializadas del mesenquima o preosteoblastos asumen la apariencia de osteoblastos y empiezan a secretar una matriz extracelular especializada. Esta matriz se mineraliza y los osteoblastos, rodeados por dicha matriz, cambian a osteocitos [5]

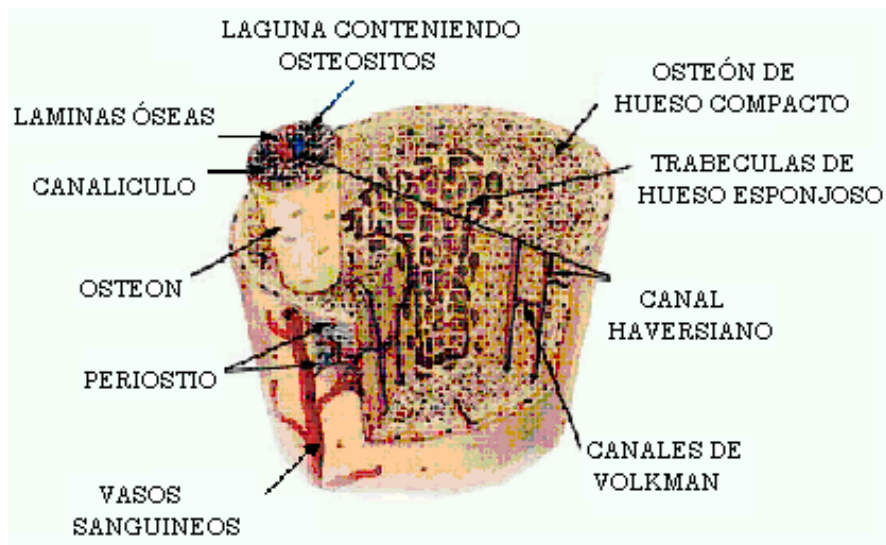


Figura 1.3 Corte de un hueso cortical, con sus estructuras internas.

Los osteoclastos son células multinucleadas responsables de la reabsorción del hueso y otros tejidos mineralizados. Se caracterizan por su gran tamaño que va de 20 a 100 μm . La reabsorción se debe a que los osteoclastos pueden mover libremente iones de hidrógeno H^+ y de esta forma modificar su pH, lo que destruye la matriz mineral ósea [2].

Durante la reabsorción ósea, los osteoclastos primero atacan la superficie del hueso y establecen un firme contacto en una zona llamada de sellado, entre la membrana celular y la matriz mineral. Los osteoclastos secretan protones y una gran variedad de enzimas proteolíticas, induciendo la resorción de las lagunas, a disolver minerales y a degradar la matriz de colágeno.

Los osteoclastos aislados de animales neonatales, pueden ser cultivados en pequeñas rodajas de hueso y ellos reabsorben hueso. De esta forma es posible obtener un modelo para estudios *in vitro* [6, 7]

En la figura 1.4 la membrana de la zona rizada es enriquecida en bombas de protones tipo vacuolar en osteoclastos activos y aparecen como envolviendo a la matriz ósea.

Los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, son células derivadas de células pluripotenciales de la médula ósea, que también da lugar a monocitos y macrófagos. Mientras que los monocitos son células mononucleadas, los macrófagos y osteoclastos son formados de la fusión de monocitos. Los osteoclastos difieren de los macrófagos, debido a que producen fosfatasa ácida. [2]

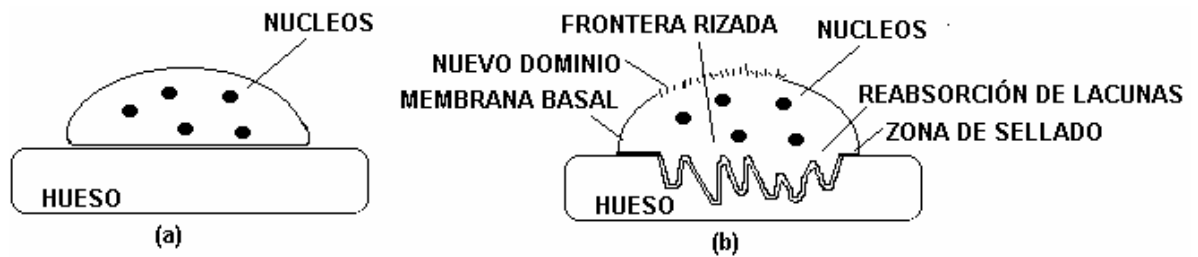


Figura 1.4 (a) Se muestra un osteoclasto sin reabsorber hueso (No-polarizado) y (b) un osteoclasto absorbiendo hueso (Polarizado) [5]

Los factores que inducen el proceso de diferenciación en las células óseas, están actualmente bajo investigación y eso incluye la proteína morfogenética, así como otras citoquinas. Las interleucinas, insulinas derivadas del factor de crecimiento y factores de crecimiento plaquetario, entre otros, afectan el efecto total de la diferenciación, de los osteoblastos *in vitro*.

1.1.3.- Nivel submicroscópico (de 1 a 10 μm)

Es posible ver las formaciones de hueso laminar. Este empieza a formarse un mes después del nacimiento y esto continúa hasta el primer año, reemplazando hueso trabecular, tan pronto como este es absorbido. Hasta la edad de cuatro años, el mayor porcentaje de hueso es laminar, posteriormente, como consecuencia del proceso de remodelación, se transforma en un hueso más maduro. Esta constituido por capas o laminillas de un espesor entre 3 y 7 μm , de fibras de colágeno, pero el arreglo y orientación de cada capa, no es del todo bien conocido. Existen diferencias entre el tipo de laminas encontradas en hueso cortical y en hueso esponjoso. La imagen más común de las fibras de colágeno en un osteón, están dispuestas en forma paralela, o helicoidal. De acuerdo a esta representación, las laminillas adyacentes tienen diferentes orientaciones ya sea longitudinal (con las fibras de colágeno a lo largo del hueso laminar) o transversal (con las fibras de colágeno perpendiculares al eje del hueso laminar). Las laminillas osteonales son envueltas alrededor de un canal central y dispuestas en forma concéntrica, secuencial. Las transversales son densas de trabéculas de fibras de colágeno.

Mientras que las longitudinales poseen unas cuantas fibras en grandes trabéculas, es decir son menos densas, con mayor cantidad de mineral. La disposición de las fibras de colágeno forman una estructura continua dentro de las laminillas

1.1.4.- Nivel nanoestructural. (Desde unos cuantos nanómetros a 1 μm)

Se notan fibras de colágeno. La cual es una proteína soluble en agua y es una componente importante del tejido elástico y conectivo. Para poder distinguirla, rodeada de minerales, es necesario llevar a cabo estudios inmunohistológicos.

La orientación de las fibras de colágeno, en relación con la muestra que se someta a pruebas mecánicas tiene efectos directos en el módulo de elasticidad. Hirsch [7] encuentra que la rigidez del hueso humano, en pruebas a flexión, decrece aproximadamente en forma lineal,

conforme la orientación se cambia. El colágeno, según estudios reportados, cambia su estructura con la temperatura y por lo tanto las propiedades del hueso. Para temperaturas mayores que 43 °C esas propiedades decrecen en forma irreversible. [8]

1.1.5. Subnanoestructura: (dimensiones menores a 1 nm)

Con esta amplificación es posible conocer la estructura molecular de elementos tales como, minerales, tipos de colágena y proteínas orgánicas no colágenas.

Los cristales minerales crecen con una orientación cristalina específica. Son alineados a lo largo de los ejes de las fibras de colágeno. La longitud promedio y ancho de las placas es de 50 x 25 nm, en tanto que el espesor de los cristales es de 2 a 3 nm. Los cristales de apatita tienen pequeñas impurezas pero son significativas, tales como HPO₄, Na, Mg, citratos y carbonatos entre otros, cuyas posiciones y configuraciones no son totalmente conocidas.

1.2 Diferenciación celular.

Caplan [9], de sus experimentos, señala que los osteoblastos, el cartílago, los tendones, los ligamentos, las células de la médula ósea, el tejido conectivo etc, pueden obtenerse a partir de las células tallo del mesénquima. Cada una de ellas con sus funciones características, como consecuencia de una diferenciación que es resultado de estímulos y biofactores que aún no están totalmente estudiados.

Para llevar a cabo las diversas funciones de un hueso normal, tales como: resorción, regulación mineral y reparación ósea, las células óseas toman formas especializadas, que se distinguen por su morfología, función y localización característica. Dichas células se originan de dos líneas celulares:

- células del mesénquima y
- células hematopoyéticas

La línea del mesénquima consiste de células no diferenciadas o preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos. La línea hematopoyética consiste de monocitos de la médula, preosteoclastos y osteoclastos.

Las células no diferenciadas del mesénquima, que tienen el potencial de convertirse en osteoblastos (conocidos como preosteoblastos), se localizan en los canales del hueso, endósteo, periostio y la médula. Se mantienen en su estado indiferenciado hasta que reciben un estímulo para su proliferación y diferenciación a osteoblastos. En la figura 1.5 se ilustra esta posible formación celular, a partir de las células tallo del mesénquima.

1.3 Biomecánica del hueso [2]

Los huesos son para el esqueleto humano, como los ladrillos a un edificio. Debido a su variedad y propiedades mecánicas, es posible tener estructuras que protegen órganos vitales internos, además de permitir el movimiento con el cuerpo erguido. A diferencia de otros materiales, tiene la capacidad de auto repararse y alterar sus propiedades y geometría, en función directa de su actividad mecánica. Por ejemplo, la densidad es una función directa de la actividad del ejercicio y de ciertas condiciones metabólicas.

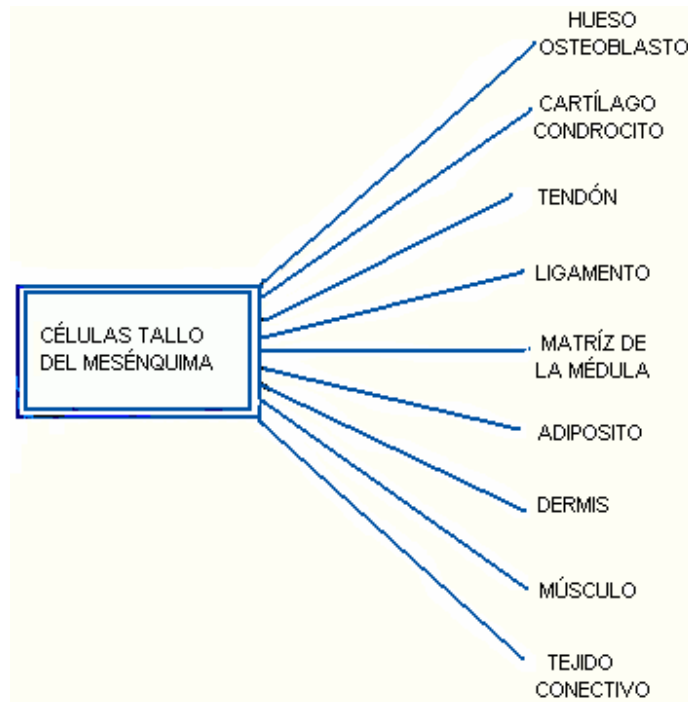


Figura 1.5 Fenotipos de células tallo mesenquimatoso. [9]

Los huesos cortical y esponjoso se diferencian por su porosidad y consecuentemente por su densidad. En la tabla 1 se presentan los valores promedio de densidades de hueso humano.

Aproximadamente el 70 % de los valores de la densidad del hueso cortical femoral están en el rango 1.8 a 1.9 g/cm^3 , mientras que el 70 % de los valores para hueso trabecular de tibia, están en el rango de 0.2 a 0.4 g/cm^3 . Esta distinción es importante porque las propiedades materiales del hueso trabecular son muy sensibles a la densidad aparente.

TABLA 1.1 Densidades características de fémur y tibia en seres humanos.

TIPO DE HUESO HUMANO	DENSIDAD [gr/cm ³]	DESVIACIÓN ESTÁNDAR, DEL VALOR PROMEDIO [gr/cm ³]
Fémur cortical hidratado	1.85	0.6 ± 3 %
Trabécula de tibia	0.3	0.1 ± 30 %

1.3.1 Hueso cortical.

Las propiedades elásticas de materiales anisotrópicos dependen de su orientación con respecto a la dirección de la carga aplicada. Sin embargo, el hueso cortical humano tiene un cierto grado de simetría, que se manifiesta en su micro estructura osteonal. Para carga transversal al eje longitudinal, estas propiedades son aproximadamente isotrópicas y significativamente diferentes de las obtenidas bajo carga longitudinal, la cual es paralela al eje de los osteones (a lo largo del eje longitudinal de la diáfisis). Por lo consiguiente, el hueso cortical humano es considerado un material transversalmente isotrópico.

El módulo del hueso cortical, en la dirección longitudinal, es aproximadamente 1.5 veces su módulo en la dirección transversa y aproximadamente 5 veces su módulo de cizallamiento. Sus relativamente altas razones de Poisson, con valores superiores a 0.6, indican que el hueso cortical tiene protuberancias cuando es sujeto a compresión no axial.

Los esfuerzos en hueso cortical, dependen de la dirección de la carga aplicada y son transversalmente isotrópicos desde ambos módulos y perspectivas de esfuerzos. El esfuerzo del hueso cortical también depende de la forma en que se aplique la carga, ya sea en tensión, compresión, o torsión. Esto representa una asimetría en las propiedades de esfuerzos.

La figura 1.6 es una curva esfuerzo-deformación para hueso cortical, en la dirección longitudinal y transversal. Esta gráfica muestra que el hueso cortical es más fuerte en compresión que en tensión. Para carga transversal, el hueso es más dúctil bajo cargas de compresión, que a tensión.

Por lo tanto, el hueso tiene su más baja resistencia a regímenes de carga que causan esfuerzos a tensión, que en la dirección transversal, como se indica en la siguiente tabla.

Debido a que los esfuerzos a tensión y compresión son aproximadamente iguales, para hueso cortical, en los últimos esfuerzos, las máximas deformaciones que el hueso puede soportar, son cercanas a su punto de cedencia, que es también similar a su punto de fractura.

TABLA 1.2 Esfuerzos comparativos que soporta el hueso.

TIPO DE ESFUERZO	DIRECCIÓN LONGITUDINAL [MPa]	DIRECCIÓN TRANSVERSAL [MPa]
TENSIÓN	130	130
COMPRESIÓN	190	130

Por otra parte, los materiales que absorben energía en forma considerable antes de la falla, son clasificados como resilientes. Biomecánicamente, la resiliencia es importante en eventos traumáticos, en los cuales el hueso es forzado a absorber energía. Si la energía entregada al hueso es mayor que la que puede absorber, ocurre la fractura.

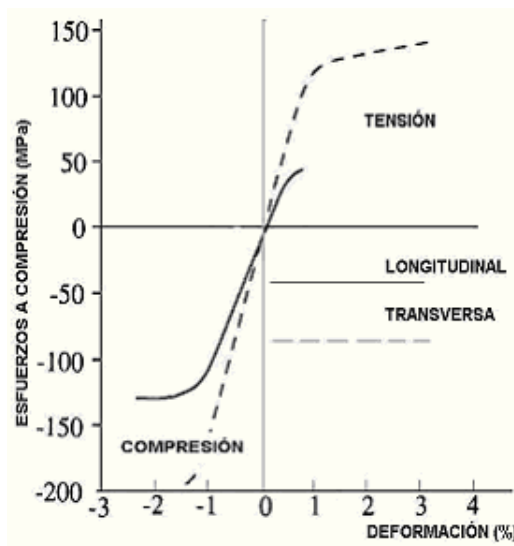


Figura 1.6 Gráfica esfuerzo-deformación para hueso cortical humano, sometido a cargas de tensión y compresión. La carga se aplicó tanto en la dirección longitudinal, como transversal. [2]

Para cargas longitudinales, el hueso cortical es un material resiliente, porque puede absorber considerable energía antes de la fractura. Además, debido a que la deformación última, es substancialmente mayor que la deformación en el punto de cedencia, el hueso cortical puede ser clasificado como un material relativamente dúctil para carga longitudinal. Tanto a tensión como a compresión, las deformaciones que ocurren a la falla son mayores que aquellas que ocurren en el punto de cedencia.

La curva esfuerzo-deformación para carga transversal, muestra que el hueso es más dúctil bajo cargas de compresión, que a tensión. Consecuentemente, el hueso tiene su mínima resistencia, a regímenes de carga que causan esfuerzos a tensión en la dirección transversal. Las propiedades mecánicas del hueso cortical son sensibles a la razón de deformación.

1.3.1.1 Efectos de la edad en el hueso cortical.

Los módulos y esfuerzos propios de hueso cortical, progresivamente disminuyen con la edad, tanto para hombres como para mujeres. El modulo longitudinal y esfuerzos de tensión en cedencia de hueso cortical, tomados de la mitad de la diáfisis femoral, decrecen aproximadamente 2 % por década después de los 20 años. Por ejemplo de la tercera a la novena década, respectivamente el ultimo esfuerzo de tensión, para carga longitudinal decrece desde aproximadamente 130 a 110 MPa y el correspondiente cambio del modulo de elasticidad, cambia desde aproximadamente 17 GPa a 15.6 GPa. La pendiente de la curva esfuerzo deformación, después de la cedencia, incrementa 8 % por década. El riesgo más significativo de fractura es la reducción de la absorción de energía (área bajo la curva esfuerzo-deformación) que ocurre con la edad. El decremento en absorción de la energía por aproximadamente 7 % por década, resulta principalmente de reducciones en la última deformación.

De lo anterior se deduce que el hueso cortical, en el fémur humano, es menos rígido, menos fuerte y más duro conforme la edad avanza.

Sus propiedades mecánicas cambian con la edad para diferentes huesos. Por ejemplo la reducción en el último esfuerzo de tensión y su módulo, son mayores para el fémur que para la tibia, aunque decrecen, sin embargo las ultimas deformaciones son similares para cada hueso, Una explicación para esto es que la razón de cambio puede ser mayor en la tibia que en el fémur y el mecanismo que reduce ambos módulos es inhibido, tan rápido como nuevos osteones son formados. Sin embargo, muchos parámetros afectan las propiedades mecánicas del hueso cortical

1.3.1.2 Micro estructura y propiedades mecánicas

Los parámetros que han sido investigados como determinantes de las propiedades mecánicas del hueso cortical, son la densidad, densidad del polvo (contenido total mineral dividido en el volumen de la masa), histología (razón del número de osteones primarios, a secundarios del hueso), composición y orientación de fibras de colágeno y composición de las líneas de cemento y acumulación de micro fracturas en la matriz ósea y alrededor de los osteones.

Es difícil correlacionar estos parámetros con las propiedades mecánicas del hueso cortical, debido a que los rangos del módulo y los valores de esfuerzos, para este tejido, son relativamente pequeños.

La correlación entre la densidad y micro estructura sugiere que, la remodelación haversiana de hueso primario, esta acompañada por una reducción en la densidad. La micro estructura afecta de alguna forma las propiedades mecánicas, a nivel microscópico.

1.3.2 Hueso trabecular:

Las propiedades mecánicas tanto del hueso cortical, como del trabecular, dependen, en forma significativa, de su posición anatómica, y edad. De estudios de densitometría se ha mostrado

que la densidad del hueso trabecular, en la cadera y columna vertebral, decrece con la edad, alcanzando los más bajos valores en mujeres. Estudios biomecánicos en cadáveres, han mostrado que las propiedades mecánicas del hueso trabecular son muy sensibles a la densidad, a la localización anatómica y a la edad. Además, pueden variar dependiendo del tipo y orientación de esas estructuras celulares, al menos un orden de magnitud.

En lo general, el módulo del hueso trabecular puede variar desde aproximadamente 10 a 2,000 MPa, dependiendo del sitio anatómico y la edad. Así mismo, el hueso trabecular es menos rígido que el cortical y tiene aproximadamente un módulo de 17,000 MPa.

Sin embargo, hay regiones en el esqueleto, tales como el cráneo, la placa subcondral, en la tibia proximal, la capa metafisiaria en el fémur proximal y los extremos de los cuerpos vertebrales, donde la distinción entre hueso trabecular y cortical, es menos clara. Valores promedio de los módulos en esas regiones, están en el rango de 1,150 a 9,650 MPa.

Al describir la conectividad, el espesor promedio, el número y separaciones entre trabeculas, se tiene una clara relación entre la densidad de la masa, número y espesor de trabeculas. Para la columna lumbar existe una fuerte relación lineal, entre la densidad y esas variables. En la región subcapital del fémur proximal, sin embargo, la relación entre el espesor trabecular y la densidad es significativamente no lineal.

Aparte de afectar su módulo, la forma de la estructura celular puede también afectar la relación de Poisson, para materiales esponjosos, como el hueso trabecular, pueden ser negativos (el material se contrae cuando es comprimido) o bien se aproxima a la unidad, dependiendo de la estructura celular.

Otro factor relacionado a la arquitectura del hueso, es la orientación de la estructura celular básica, reflejada como la orientación promedio de la estructura trabecular. La orientación de trabeculas individuales es controlada principalmente por la dirección de las fuerzas aplicadas al esqueleto, de acuerdo a la ley de Wolff.

La arquitectura diferente que existe para el hueso trabecular, resulta en una anisotropía de propiedades elásticas. En contraste al hueso cortical, el hueso trabecular es aproximadamente isotrópico en algunos sitios anatómicos (húmero proximal) y altamente anisotrópico (parte alta de la columna lumbar). Debido a que tiene características tanto anisotrópicas, como heterogéneas, es difícil generalizar acerca de sus propiedades elásticas. Ver figura 1.7

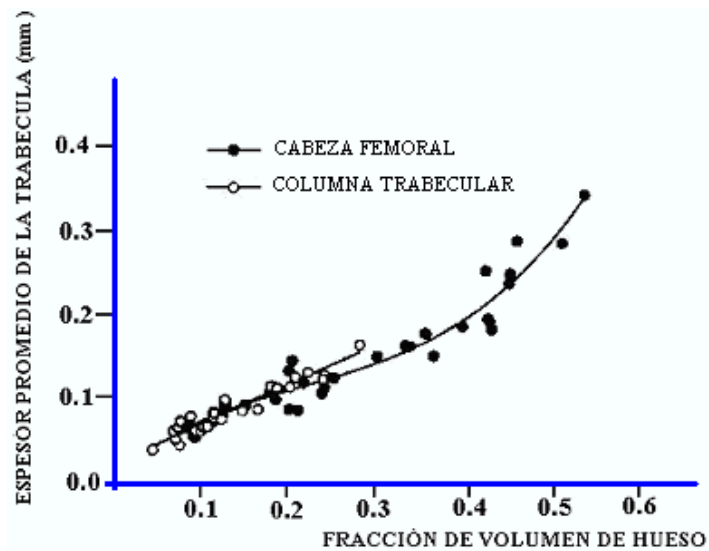


Figura 1.7 Espesor de la trabécula en la columna lumbar y en la región subcapital del fémur, como una función de la fracción de volumen de hueso. [2]

1.3.2.1 Efectos de la edad en el hueso trabecular: [2, 11]

Tanto la densidad como la arquitectura del hueso trabecular, varían con la edad al incrementar su fragilidad, la cual es asociada con una gran incidencia en columna vertebral y cadera.

La reducción en la densidad depende de varios factores, incluyendo la edad y sitios anatómicos. En general la densidad mineral (refleja la densidad tanto de hueso cortical, como trabecular) se reduce con la edad y alcanza sus más bajos valores en mujeres, resultando en igual reducción tanto en masa de hueso cortical, como trabecular.

Resultados de estudios histomorfométricos han mostrado que, por envejecimiento, la arquitectura en hueso trabecular cambia. Esos estudios indican que al disminuir la densidad, el número y espesor de los espacios de las trabéculas, también se reducen.

Debido a que los esfuerzos en el hueso trabecular dependen de la densidad y arquitectura, cambios relacionados a la edad, pueden substancialmente debilitarlo. Por ejemplo, la falla causada por pandeo de trabéculas individuales, es más probable cuando las trabéculas, son pocas, delgadas y largas. Esta reducida resistencia a la falla, causada por pandeo y debida a tres factores independientes: reducción en su número, decremento en el espesor e incremento en la longitud, contribuyen a los mecanismos de debilitamiento.

1.4 La fractura ósea [2, 11, 12, 13, 14]

La fractura ósea es el resultado de aplicar esfuerzos mayores a los esfuerzos límite de la resistencia mecánica de la estructura, ya sea por la acción directa de una fuerza, o bien por fatiga. En este caso, los esfuerzos desarrollados pueden causar micro fracturas. La fractura ósea se clasifica de varias maneras, como se muestra en la siguiente figura. 1.8

1. Por su localización anatómica:

proximal
media
distal
tercio de la diáfisis
supracondilíea
subtrocantérica

2. Por la dirección del trazo de la fractura:

transversa
oblicua
espiral

Por la extensión del trazo de la fractura:

lineal
cominuta

4. Fracturas patológicas:

Sucedan en huesos debilitados por algún tipo de enfermedad. Generalmente la fuerza necesaria para que se lleve a cabo la fragmentación ósea, es menor que la necesaria en un hueso semejante, pero sano.

5. Fracturas por fatiga:

Este tipo de fracturas puede suceder por la aplicación de cargas repetidas, en bailarinas, deportistas, militares, etc.

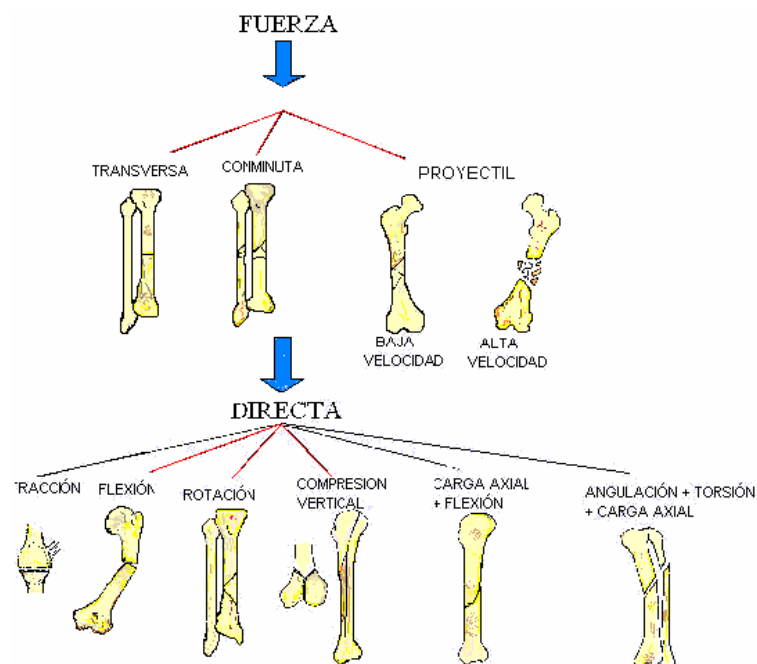


Figura 1.8 Formas más comunes de fracturas óseas, y los mecanismos que las producen. [15]

Los esfuerzos que causan una fractura ósea, se deben a factores que pueden ser de dos tipos:

Extrínsecos
Intrínsecos.

Los factores extrínsecos son la magnitud, la duración y dirección de las fuerzas que actúan en el hueso, o también la velocidad con la cual el hueso es cargado.

Factores intrínsecos son la capacidad de absorción de energía, módulo de elasticidad, energía de deformación, etc.

Los esfuerzos que pueden soportar los huesos dependen de la densidad ósea, el contenido mineral, la cantidad y calidad de colágeno. Se sigue de esto, que alguna condición que disminuya esos atributos (osteoporosis, osteomalasia, etc) incrementara la susceptibilidad a la fractura. El nivel de estos esfuerzos es función de la rigidez longitudinal total del hueso.

1.5 Mecanismos de reparación del hueso.

La forma en que se puede atender una fractura ósea, depende mucho del tipo de hueso que haya sufrido el traumatismo y el tipo de fractura, así como del sitio fracturado. En tales casos es posible, que solamente se alinien los fragmentos del hueso y se mantengan unidos mediante una férula. O bien, que la situación sea más compleja y se usen elementos de osteosíntesis, tales como implantes, clavos intramedulares y tornillos. En todos los casos, si no se presenta una infección y los fragmentos están bien vascularizados, el proceso de consolidación se lleva

a cabo en cuatro etapas [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18] que se caracterizan conforme a lo descrito a continuación y que se muestra en la figura 1.9

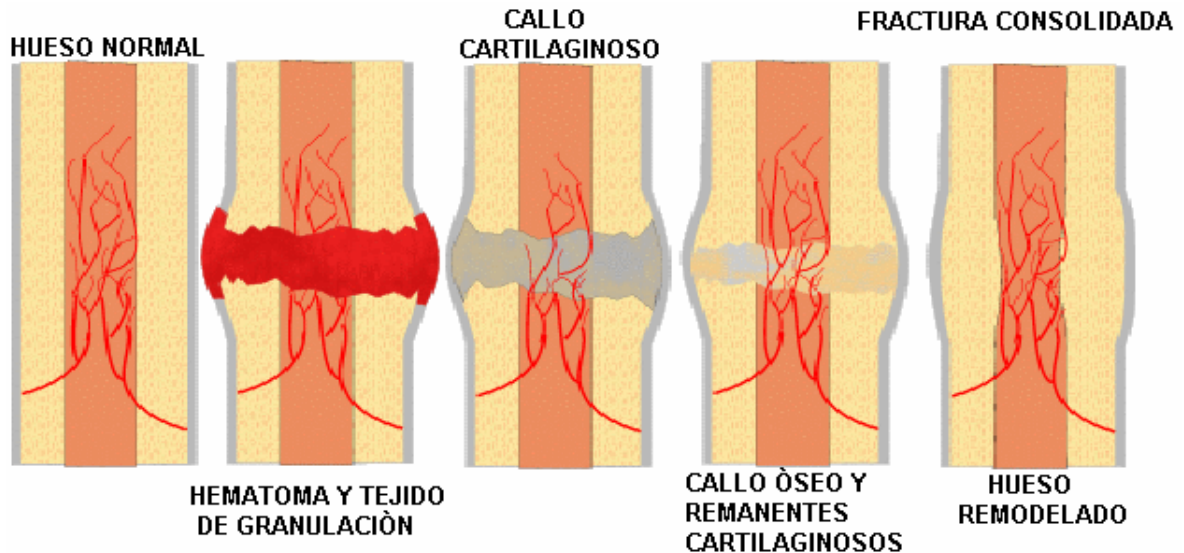


Figura 1.9 Etapas de la consolidación de la fractura ósea.

Inflamación.

Sé inicia en el instante mismo en que sucede la fractura. Sus características son las siguientes:

- Se genera un aumento en la vasodilatación de los capilares próximos a la zona lesionada, como consecuencia inmediata hay un aumento de la perfusión sanguínea que se manifiesta por un enrojecimiento local.
- El aumento de la perfusión sanguínea y la activación de los procesos metabólicos se acompaña de la producción de calor, liberación de suero sanguíneo y migración activa de células inmunitarias.
- Este proceso puede dar lugar a la liberación de productos que contribuyen a la desintegración de proteínas y de células osteoprogenitoras al sitio de la fractura.
- Las células osteoprogenitoras son diferenciadas o inducidas a preosteoblastos, que cuando son estimuladas apropiadamente, inducen células formadoras de hueso. Algunas de esas células como osteocitos, células del periostio y del endosito son capaces de formar hueso, pero no se encuentran activas, al momento de la fractura. Primitivas células pluripotenciales y primitivos fibroblastos adyacentes a los tejidos blandos también pueden ser atraídas a la zona del trauma.
- La fiebre incrementa las transformaciones metabólicas y produce un aumento de la perfusión sanguínea y de la cantidad de anticuerpos y células inmunitarias en todo el

organismo.

- Al mismo tiempo aumenta la capacidad de agregación de plaquetas. Esto se manifiesta mediante una elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Factores o sustancias que inducen este proceso son conocidos como osteoinductores y el proceso es conocido como osteoinducción. Se han identificado factores bioquímicos, biofísicos y mecánicos que tienen una importante participación. Osteoinductores específicos pueden ser la proteína morfogenética (BMP) y los campos electromagnéticos.

Para que se inicie y continúe el proceso de regeneración ósea, es importante contar con una superficie osteoinductiva y células osteoprogenitoras que permiten llevar a cabo arreglos tridimensionales de la masa ósea.

Varios estados químicos y biofísicos que gobiernan la inducción de células osteoprogenitoras, son claramente importantes tan pronto como sucede el daño; sin embargo en estadios posteriores pueden ser gobernados por diferentes factores que estimulan la remodelación a lo largo de líneas de esfuerzos. Todo este evento puede durar de 2 a 3 semanas.

Formación del callo blando.

Esta etapa se inicia 2 o 3 semanas después del traumatismo. Sus características son las siguientes:

El dolor y la inflamación decrecen.

- Incrementa la vascularidad
- Después de ser alineados los fragmentos óseos, si está bien irrigado el periostio, se manifiesta un incremento lento de la sección transversal y el momento de inercia. Esto es porque aumenta el contenido de minerales en el callo de la fractura dentro de los tres meses posteriores a la fractura. La rigidez y formación de nuevo hueso, predominan en esta etapa del proceso.
- Para delimitar y controlar el proceso se produce fibrina.
- Las células inmunitarias que se encontraban en el lugar de la lesión o que procedían de otras zonas, comienzan a multiplicarse.
- Lo que indica una correlación directa entre el contenido mineral del callo de la fractura y sus esfuerzos mecánicos.

Formación del callo duro.

De 4 a 8 semanas después del traumatismo. Sus características son las siguientes:

- Se ha transformado el callo cartilaginoso o esponjoso en osificación endocondral.
- Se han formado puentes sólidos que unen los fragmentos en el trazo de la fractura. Estas estructuras son visibles en rayos X. después de un total de 8 a 12 semanas después del daño, el nuevo hueso ha llenado completamente el sitio de la fractura.

Al final de este estadio la fractura es considerada consolidada, generalmente a un paciente se le puede dar de alta.

Remodelación ósea.

Aproximadamente 8 semanas, después del daño, el trazo de la fractura se inicia la una auto remodelación, corrigiendo cualquier deformidad que pueda permanecer como un resultado del traumatismo. Este estado final de consolidación puede tardar varios meses, incluso años, según sean las secuelas de la fractura.

La razón de consolidación y la habilidad a remodelar el hueso fracturado varía considerablemente de persona a persona, dependiendo de:

- edad,
- tipo de fractura y
- hueso involucrado.

Por ejemplo, los niños son capaces a remodelar sus huesos mucho más rápido que los adultos y estos más rápidamente que los ancianos. Sin embargo, puede ser que una persona aún siendo joven, tenga una vida sedentaria y en este caso, el proceso completo de la consolidación, es más lento que si no lo fuera.

Una fractura de diáfisis con tres fragmentos, en una zona de pobre contenido vascular, tal como el tercio distal de la tibia, producirá la muerte del fragmento intermedio. Ello es debido a la ruptura de la arteria nutricia entre el fragmento proximal y el medio que impide la circulación endóstica, a la vez que la circulación perióstica es interrumpida por el desprendimiento del periostio de su conexión a la cortical de la diáfisis. Posteriormente, desplazamientos de los fragmentos durante el transporte y el tratamiento, contribuyen a aumentar la interrupción vascular inicial.

En fracturas sin desplazamiento, en las que los extremos de los fragmentos se hallan en oposición exacta, no ocurre la reabsorción lacunar. En fracturas con desplazamiento considerable, el callo perióstico de un lado se conecta con el endóstico del otro y la unión se efectúa por medio de la continua formación perióstica, que sería aún más apropiado llamar periférica, de hueso nuevo por un lado y la fusión de las dos mitades del callo endóstico correspondiente a los fragmentos, por el otro. El moldeamiento progresivo acaba por contornear el hueso al nivel de la fractura, de acuerdo con sus características previas.

1.6 Causas del retardo en la consolidación ósea.

- Deficiente irrigación de sangre en el sitio de la fractura.

- Inadecuada inmovilización
- Desordenes sistémicos, como puede ser la uremia.
- Interposición de tejido suave entre los fragmentos fracturados.
- Infección en el sitio de la fractura.
- Fracturas patológicas.
- Distracción inadecuada de los fragmentos fracturados.
- Tipo de la fractura, por ejemplo una fractura cominuta puede tener como consecuencia daño en los tejidos blandos que cubren el hueso y por lo tanto un pobre suministro de sangre en esa zona.
- Alto consumo de nicotina, ya que esto reduce el contenido de oxígeno que es necesario en la formación de colágeno y como consecuencia aumenta la probabilidad de reducir la densidad mineral. [19, 20, 21]
- Alto consumo de alcohol: El cuerpo humano monitorea la concentración de calcio y responde a través de la acción de hormonas, vitaminas y factores de crecimiento locales, que regulan la distribución de calcio, entre la sangre y los huesos. El alcohol puede alterar ese balance, al afectar las hormonas que regulan el metabolismo del calcio. [22, 23]

1.7 Planteamiento del problema e hipótesis:

La consolidación ósea es un proceso que en muchos casos llega a retardarse, o bien solamente dar lugar a una pseudo artrosis, como consecuencia de problemas vasculares, metabólicos, o bien de otro tipo. Es en estos casos cuando se tiene la necesidad de aplicar alguna forma de acelerar ese proceso natural. La terapia láser es una opción que puede ser aplicada bajo la correcta selección de pacientes.

En este trabajo se pretende estudiar la estimulación del proceso de la consolidación ósea por medio del láser, en un modelo en ratas y como consecuencia de ello, establecer un modelo matemático que permita determinar el porcentaje de osteogénesis.

1.7.1 Hipótesis.

Al aplicar energía láser (fotones), de acuerdo a su espectro de absorción, es posible estimular, de forma selectiva, algunas estructuras de la mitocondria (citóchromas) y su membrana. De esta forma se inicia un incremento de ADN y de los niveles de ATP. Como consecuencia se manifiestan cambios fisiológicos, tales como un incremento de la proliferación endotelial, incremento de la diferenciación de fibroblastos, de la microvascularidad etc. Lo cual tiene un impacto importante en la reducción de la cicatrización, así como de su calidad. También la consolidación ósea es favorecida y se manifiesta en una reducción del tiempo de consolidación.

1.8 Metodología de este trabajo:

La metodología de este trabajo se presenta con detalle en el capítulo cinco. Aquí solamente se expone el trabajo de investigación por etapas, señalando los aspectos más importantes.

1.8.1 Por etapas:

- Definición clara del problema que se desea estudiar
- Recopilación bibliográfica
- Diseño experimental
- Adquisición de animales, materiales y equipo necesarios para iniciar y continuar el proyecto
- Selección de dos grupos de animales, para formar dos grupos de trabajo (control y experimental)
- Determinación de las pruebas de control y el número de ellas
- Análisis de resultados del grupo control
- Diseño de equipo estimulador
- Trabajo con el grupo experimental
- Análisis de resultados del grupo experimental
- Análisis comparativo de ambos grupos de estudio
- Elaboración de resultados de este trabajo
- Presentación final para su publicación

1.8.2 Resultados esperados.

Si la hipótesis es correcta se espera obtener los siguientes resultados:

- Desarrollar el equipo que permita estimular la consolidación de la fractura ósea, en función de la aplicación de radiación láser de baja potencia.
- Al aplicar el láser determinar si se reduce el tiempo de consolidación de la fractura ósea.
En
caso de que así sea, conocer en que porcentaje con respecto a un grupo de fracturas control.
- Establecer una relación entre algunos parámetros que intervienen en el proceso de la consolidación como función del tiempo. (Modelo de la consolidación de la fractura ósea, como función del tiempo).
- Establecer una relación entre parámetros ópticos y estadios de la consolidación de la fractura ósea.

- Establecer una relación entre parámetros ópticos y algunos elementos bioquímicos que estén presentes en el proceso de la consolidación de la fractura ósea.

REFERENCIAS

1. Ja-Young Rho, Lisa Kuhn-Spearing, Peter Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Medical Engineering & Physics*, 1998, 20, 92-102
2. Sheldon R. Simon, *Orthopaedic Basic Science*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994, 143-161
3. Buckwalter J.A., Glimcher J., Cooper R.:R., Recker R., Bone biology, *J. of Bone and Joint Surgery*, Vo 77A, No 8, Agosto 1995, 1256 -1275
4. <http://homepage.mac.com/myers/misc/bonefiles/bonestruct.html>
5. Jari Salo, Kelervo Metsikko, Harri Palokangas, Petri Lehenkari, H. Kelervo Vaananen, Bone-resorving osteoclasts reveal a dynamic division of basal plasma membrane into two different domains, *J.Cell Science*, 1996, 109, 301-307
6. Marijke E. Holtrop, Gregory J. King, The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, No 123, marzo-abril, 1977, 177-194
7. Hirsch C., Da Silva O., The effect of orientation on some mechanical properties of femoral cortical specimens, *Acta Orthop. Scand.*, 1967, 38-45
8. Yamashita J, Li X, Furman BR, Rawls HR, Wang X, Agrawal CM., Collagen and bone viscoelasticity: A dynamic mechanical analysis, *J Biomed Mater Res* 2002; 63(1):31-36
9. Arnold I. Caplan, *Journal of Orthopaedic Research*, Mesenchymal stem cells, 1991, Vo 9, No 5, 641-650
10. Ma. Teresa Valenzuela Vargas, *Apuntes de histología humana*, Instituto Politécnico Nacional, 1998, 83-90
11. Aki Hoshi, Hiromi Watanabe, Momoko Chiba, Yutaka Inaba, Effects of exercise at different ages on bone density and mechanical properties of femoral bone of aged mice, *Tohoku J. Exp. Med.*, 1998, 185 (1)
12. Trueta Joseph, *La estructura del cuerpo humano*, Edit Labor, 1975, 53- 260
13. Johnston III, Problems that can occur during fracture healing, *Hughston health alert*, *Hughston Health Alert*, <http://www.hughston.com/hha/a.fracture.htm>
14. D. N., Ghista, R, Roaf, *Orthopaedic Mechanics*, Academic Press, 1978, 123-229
15. Rockwell A. Charles, Green P. David, Bucholts W. Roberts, *Fracturs in adults*, Lippincott Company, 1991, 3a Edición, Vo1, 9
16. David H, Cormack, *Histología de Ham, Harla*, 9ª edición, 1987, 387- 398
17. Heinrich WRBA, Otto Pecher, *Sustancias del futuro*, Edikamed, 1996, 65, 66
18. P. J. Millet, B. Cohen, M. J. Allen, N. Rushton, Bone mineral density changes during fracture healing: a densitometric study in rats, <http://www.rz-nidueseseldorf.de/WWW/Medfak/Orthopaedie/journal/.../tx3-3498>
19. <http://www.hop.man.ac.uk/orth/fracture/orthopaedic2a.html>
28/09/2000
20. Hopper JL, Seeman E, The bone density of female twins discordant for tobacco use, *Engl J Med*, 1994, 330(6), 387-92
21. Johnston JD, Smokers have less dense bones and fewer teeth, *J R Soc Health*, octubre 1994, 114(5), 265-9
22. Hollenbach KA, Barrett-Connor E., Edelstein SL, Hobrook T, Cigarette smoking and

- bone mineral density in older men and women, Am J Public Health, septiembre 1993, 83(9), 1265-70
23. Joseph A. Martino, Angelo Galante, Smoking can it affect bone healing, Hughston Health Alert, <http://www.hughston.com/hha/a.smoke.htm> H. Wayne Sampson, Alcohol's harmful effects on bone, Alcohol Health & Research World, 1998, Vo 22, No 3, 190- 194

CAPÍTULO 2



ESTUDIOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DEL CALLO ÓSEO

En este capítulo se presentan los estudios efectuados en esta investigación, para conocer de que forma evoluciona el callo óseo y que parámetros son los que es posible considerar posteriormente, al proponer un modelo matemático de la consolidación ósea con la estimulación del láser.

CAPÍTULO 2

ESTUDIOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DEL CALLO ÓSEO.

En esta sección se explican las bases teóricas de los métodos y técnicas empleadas para conocer el avance de la consolidación ósea en los animales de estudio. Posteriormente en el capítulo 5 se presentará la metodología con detalle y en el capítulo 7 los resultados.

2.1 Estudio biomecánico.

El análisis biomecánico se hará al someter a cargas flexionantes las tibias de animales que se estudien de acuerdo al protocolo de investigación.

Como antecedente teórico se considera lo siguiente; conforme al protocolo planteado al someter una viga a flexión a tres puntos como se muestra en la siguiente figura.

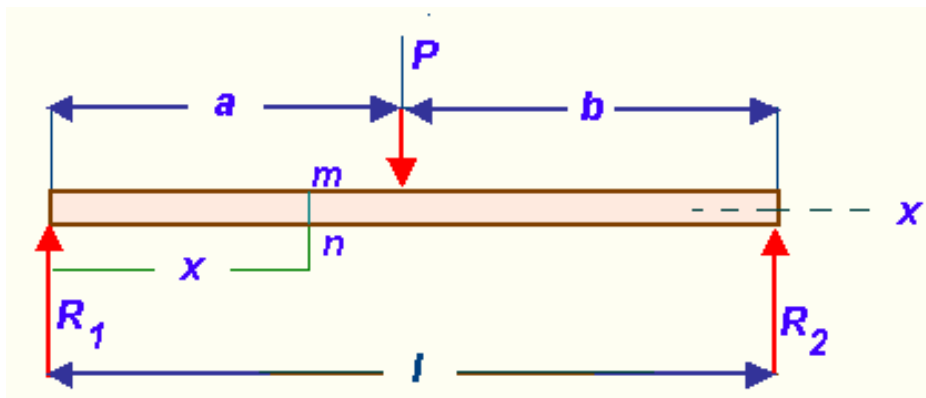


Figura 2.1 Viga sometida a flexión a tres puntos.

Se observa lo siguiente:

- La reacción de los puntos de apoyo R1 y R2
- La fuerza de aplicación P.

Para cualquier sección transversal a la izquierda de P, la fuerza cizallante, está determinada como:

$$R_1 = \frac{Pb}{l}$$

y a la derecha de P, la fuerza cizallante, está determinada como:

$$R_2 = \frac{Pb}{l} - P \quad (2.2)$$

En un estudio de flexión a cuatro puntos la resistencia mecánica, de una viga o de una pieza de estudio, corresponde a toda la estructura, mientras que a tres puntos la acción de la fuerza se ejerce en un área muy pequeña. Es la razón por la cuál se decidió por este último método para conocer la resistencia mecánica, como función de la formación del callo óseo en el trazo de fractura. [1]

De la figura 2.1 se observa que el momento flexionante en cualquier sección mn es la suma algebraica de los momentos de todas las fuerzas verticales. Para cualquier punto a la izquierda de P el momento está determinado de acuerdo a la ecuación (2.3):

$$M = R_1x = \frac{Pb}{l}x \quad (2.3)$$

Para cualquier punto a la derecha de P, se tiene:

$$M = R_1x - P(x - a) \quad (2.4)$$

La distribución de momentos flexionantes aplicada al caso de las tibias de estudio es indicada en la figura 2.2

El desarrollo experimental de este estudio se llevará a cabo en la máquina universal Instron modelo 4502, del laboratorio de biomecánica del C.N.R..

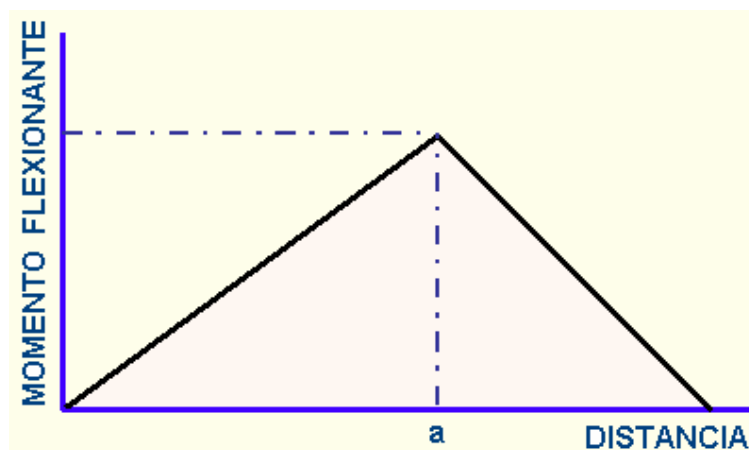


Figura 2.2 Distribución de momentos de la viga sometida a flexión en tres puntos.

2.2 Estudio foto acústico [2].

El efecto foto acústico, también conocido como opto acústico, fue descubierto por Alexander Graham Bell en 1880. Motivado por esta investigación Bell posteriormente experimenta con sólidos, líquidos y gases, entiendo el potencial de este efecto como técnica espectroscópica. Deduce que el efecto es el resultado del movimiento mecánico de los sólidos.

El efecto foto acústico se puede entender a partir de principios térmicos y mecánicos. Esto debido a que el sonido (onda mecánica) se debe a movimientos vibratorios determinados por ciclos alternados de calentamiento-enfriamiento, del gas (aire) dentro de la celda fotoacústica, por radiaciones intermitentes incidentes, principalmente en las capas gaseosas en la frontera de los sólidos.

2.2.1 Modelo de Rosencwig y Gersho para explicar el fenómeno fotoacústico.

Al igual que en el caso de los gases, cuando un sólido absorbe una radiación óptica, esta energía puede ser liberada por procesos radiactivos (fluorescencia, fosforescencia) y no radiactivos (calor). Rosencwig y Gersho explicaron el fenómeno foto acústico en sólidos a partir de resolver las ecuaciones de flujo de calor dentro de la celda. Para ello se considera una celda de geometría cilíndrica como se muestra en la figura 7.3 de diámetro D y longitud L , dentro de la cual se coloca la muestra del sólido con igual diámetro D y espesor l . Para simplificar es posible plantear un modelo unidimensional.

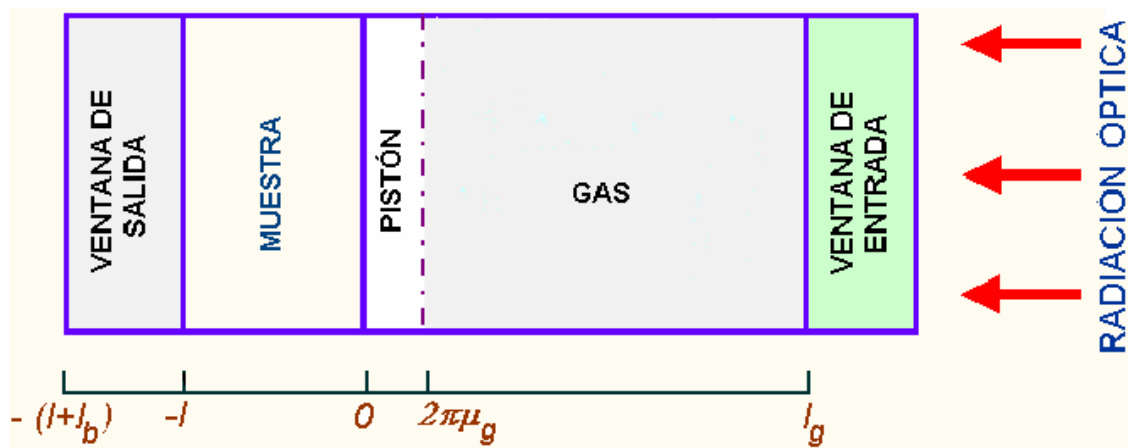


Figura 2.3 Modelo esquemático de Rosencwig y Gersho del efecto foto acústico.

La muestra limita con el gas (aire) y la ventana de salida. La cavidad de la celda es tal que $L < \lambda_{ac}$ (Esto quiere decir que la longitud de onda acústica es más grande que la longitud de la celda, sin embargo, cuando se trabaja con gases la longitud de la celda si es comparable con la longitud de onda acústica) y se puede despreciar la convección térmica. Las ventanas son transparentes y no constituyen una fuente de calor.

La radiación óptica incidente es monocromática, de una densidad de potencia I_o y es modulada periódicamente.

$$I = \frac{1}{2} I_o (1 + \cos \omega t) \quad (2.5)$$

El coeficiente de absorción del sólido $\beta[\text{cm}^{-1}]$ se determina aplicando la ley de Beer –Lambert [3]. La densidad de calor producida en cualquier punto x del sólido, debido a la luz absorbida es determinada por:

$$q(x) = \frac{1}{2} \beta I_o e^{\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (2.6)$$

donde x toma valores negativos ya que el sólido se encuentra desde $x = 0$ hasta $x = -l$, con la luz incidente en $x = 0$. Entonces, la ecuación de difusión de calor en el sólido, donde ϕ es la temperatura, se escribe de la siguiente forma:

Para $-l < x < 0$.

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \phi}{\partial t} - A \frac{\beta}{2k} I_o e^{\beta x} (1 + e^{j\omega t}) \quad (2.7)$$

Donde:

ϕ = temperatura

α = difusión del sólido = $k/\rho c$

k = conductividad [W/cm⁰K]

c = calor específico [J/g⁰K]

$A = \beta I_o / \eta 2k_s$

η = eficiencia a la cual la luz es absorbida con una longitud de onda determinada. Se considera igual a 1, en este trabajo.

Ahora bien, puesto que se desprecia la absorción de calor tanto en el gas como en las ventanas de salida, esto es en $-l-l_b \leq x < l$ la ecuación 2.7 se puede escribir como:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad (2.8)$$

Donde:

α_b = difusión del material de la ventana de salida [cm/s]

Para el gas $0 \leq x < l_g$ en se tiene:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad (2.9)$$

Donde:

α_g = difusión del gas [cm/s]

La parte real de ϕ representa la componente de temperatura que varía por la acción de la luz modulada dentro de la celda. Es decir, la temperatura total se puede determinar por la siguiente relación:

$$T(x,t) = \text{Re}[\phi(x,t)] + T_0 \quad (2.10)$$

Donde T_0 es la temperatura ambiente.

Para poder encontrar las soluciones de las ecuaciones de difusión de calor dentro de la celda foto acústica, se deben tomar en cuenta las condiciones de frontera. Estas se obtienen a partir de las ecuaciones de temperatura y del flujo de calor en las fronteras sólido-ventana y sólido-gas, además de la condición de que en los extremos de la celda la componente de temperatura, dependiente del tiempo es cero, o sea que en $x = l-l_b$ y $x = l_g$ la temperatura no varía por la acción de la luz absorbida en el sólido, sino que se mantiene constante a T_0

$$\phi_g(0, t) = \phi_s(0, t)$$

$$\phi_b(-L, t) = \phi_s(-L, t)$$

$$k_g \frac{\partial \phi_g(0, t)}{\partial x} = k_s \frac{\partial \phi_s(0, t)}{\partial x}$$

$$k_b \frac{\partial \phi_b(0, t)}{\partial x} = k_s \frac{\partial \phi_s(0, t)}{\partial x}$$

Al resolver estas ecuaciones diferenciales parciales, con las condiciones de frontera mencionadas, se obtiene la temperatura $\phi(x, t)$, en las distintas secciones de la celda.

$$\phi(x,t) = \begin{cases} \left(1 - \frac{x}{l_g}\right) \theta_o + \theta e^{(-\sigma g x + i \omega t)}; 0 \leq x \leq l_g \\ e_1 + e_2 x + d e^{(\beta x)} + [U e^{\sigma x} + V e^{-\sigma x} - E e^{\beta x}]; -l \leq x \leq 0 \\ \frac{1}{l_b} (x + l + l_b) W_o + W e[\sigma_b (x + l) + i \omega t]; l - l_b \leq x \leq -l \end{cases}$$

$$(2.11)$$

Donde:

W, U, V y θ son constantes complejas.
 e_1, e_2, d, W_0 y θ_0 son constantes reales.

$$\sigma_n = (1 + i)a_n$$

$$a_n = (w/2a_n)^{1/2}$$

En particular θ y W representan la amplitud compleja de la componente periódica de la temperatura en la frontera sólido-gas ($x = 0$) y en la frontera sólido ventana de salida ($x = -l$) respectivamente. Así mismo, θ_0 y W_0 representan la componente no periódica de la temperatura (con respecto a la temperatura ambiente) en las mismas fronteras. Las constantes d y E están determinadas por el término de densidad de fuentes de calor en la ecuación 2.7 y se expresan como:

$$d = -\frac{I_0}{2k\beta} \quad (2.12)$$

$$E = \frac{\beta I_0}{2k(\beta^2 - \sigma^2)} \quad (2.13)$$

Las condiciones de frontera se aplican por separado a la componente periódica y a la independiente del tiempo, de aquí obtenemos las siguientes relaciones entre los coeficientes de la solución 2.11 Para la componente independiente se tiene:

$$\theta_0 = e_1 + d \quad (2.14)$$

$$W_0 = e_1 - e_2 l + d e^{-\beta l} \quad (2.15)$$

$$-\frac{k_g}{l_g} \theta_0 = k e_2 + k \beta d \quad (2.16)$$

$$\frac{k_g}{l_b} W = k e_2 + k \beta d e^{-\beta l} \quad (2.17)$$

Para la componente periódica se tiene:

$$\theta = U + V - E \quad (2.18)$$

$$E = Ue^{-\sigma l} + V e^{\sigma l} - Ee^{-\beta l} \quad (2.19)$$

$$k_b \sigma_b W = Ue^{-\sigma l} - kV \sigma e^{\sigma l} - k\beta E e^{-\sigma l}$$

Sustituyendo los valores de los coeficientes en la ecuación 2.11 se obtiene la expresión para la componente periódica de la temperatura en la celda foto acústica, en la frontera sólido-gas, a través de los parámetros ópticos, térmicos y geométricos del sistema.

$$\theta = \frac{\beta I_o}{2k(\beta^2 - \sigma^2)} \left[\frac{(r-1)b+1)(b-1)e^{-\sigma l} + 2(br)e^{-\sigma l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma l} - (g-1)e^{-\sigma l}} \right] \quad (2.20)$$

Donde:

$$b = k_b a_g / k a$$

$$g = k_g a_g / k a$$

$$r = (1-i)b/2a$$

De esta manera, es posible evaluar esta magnitud compleja, cuyas parte real θ_1 e imaginaria θ_2 determinan las componentes en fase y de cuadratura de la variación periódica de la temperatura en la superficie del sólido ($x = 0$). Concretamente, la temperatura en $x = 0$ está dada por la siguiente expresión:

$$T(0, t) = \phi + \theta_0 + \theta_1(\cos \omega t - \theta_2 \sin \omega t) \quad (2.21)$$

Donde:

ϕ = temperatura ambiente en las paredes y extremos de la celda

θ_0 = incremento de la componente de la temperatura independiente del tiempo debido a la absorción de la radiación óptica incidente.

En seguida se toma en cuenta la generación de la señal acústica como resultado del flujo de calor periódico, desde la superficie del sólido hacia el gas. Este proceso periódico de difusión produce una variación periódica de la temperatura del gas, dada por la siguiente expresión:

$$\phi_{ac}(x, t) = \theta e^{(-\sigma_g x + j\omega t)} \quad (2.22)$$

La parte real corresponde a la variación de temperatura como magnitud física:

$$T_{ac}(x,t) = e^{-a_g x} [\theta_1 \cos(\omega t - a_g x) - \theta_2 \sin(\omega t - a_g x)] \quad (2.23)$$

Esta componente, dependiente del tiempo, tiende rápidamente a cero con el aumento de la distancia, hasta la superficie del sólido. A una distancia de $2\pi/a_g = 2\pi/\mu_g$

Donde:

μ_g = longitud de difusión térmica,

La variación periódica de la temperatura en el gas es prácticamente cero. Por lo que se puede considerar que, el gas contenido en esta capa fronteriza (pistón) es el único que responde térmicamente ante las variaciones periódicas de la temperatura en la superficie del sólido y su temperatura promedio puede escribirse como:

$$\bar{\phi}(t) = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} \phi_{ac}(x,t) dx \quad (2.24)$$

al tomar en cuenta la ecuación 2.22 se tiene:

$$\bar{\phi}(t) = \frac{1}{2\sqrt{2\pi}} \theta e^{i(\omega t - \frac{\pi}{4})} \quad (2.25)$$

Debido al calentamiento periódico del gas, esta capa se expande y contrae actuando como un pistón acústico sobre el resto de la columna de gas. El recorrido de este pistón de gas se puede estimar al hacer la suposición de que se trata de un gas ideal, considerando que tiene un comportamiento isotérmico y que el promedio de la componente de la temperatura que no depende del tiempo es:

$$T_o = \phi + \theta_o \quad (2.26)$$

Entonces

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \frac{\bar{\phi}(t)}{T_o} = \frac{\theta\mu_g}{T_o\sqrt{2}} e^{i(\omega t - \frac{\pi}{4})} \quad (2.27)$$

Suponiendo que el resto del gas responde adiabáticamente, podemos obtener la presión generada en la celda fotoacústica por la relación del pistón, utilizando la ley de los gases adiabáticos:

$$PV^\gamma = \text{const} \quad (2.28)$$

Donde:

P = presión

V = volumen

γ = relación de los calores específicos a presión y volumen constantes.

Para el incremento de presión se tiene:

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_o}{V_o} \delta V = \frac{\gamma P_o}{l g} \delta x(t) \quad (2.29)$$

Donde:

P_o = presión inicial

δV = variación del volumen

V_o = volumen inicial

Substituyendo la ecuación 2.27 en 2.29 se obtiene:

$$\delta P \delta t) = \frac{\gamma P_o \theta}{\sqrt{2} l_g a_g T_o} e^{\left[i(\omega t - \frac{\pi}{4}) \right]} = Q e^{\left[i(\omega t - \frac{\pi}{4}) \right]} \quad (2.30)$$

La variación de la presión ΔP esta dada por la parte real de δP y puede escribirse como.

$$\Delta P(t) = q \cos \left(\omega t - \varphi - \frac{\pi}{4} \right) \quad (2.31)$$

Donde:

q = amplitud

φ = fase

Es esta variación de presión, la que se detecta por medio de un micrófono de letrectec, como se indica en la figura siguiente:

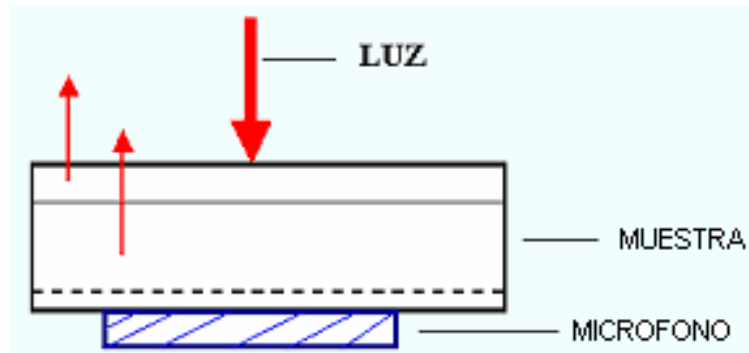


Figura 2.4 Generación de la señal fotoacústica.

La muestra que se desea estudiar se coloca en una celda cerrada que tiene la forma de un cilindro de latón y sus extremos se cubren con ventanas de cuarzo. La luz que incide en la muestra es interrumpida periódicamente a una frecuencia f (17 Hz), por un disco giratorio que tiene una ranura radial (chopper). La luz entra a la celda por su parte superior y en la parte inferior se coloca un micrófono, como se muestra en la figura 2.4

El arreglo experimental del equipo para estudios fotoacústicos es el que se muestra en la figura siguiente:

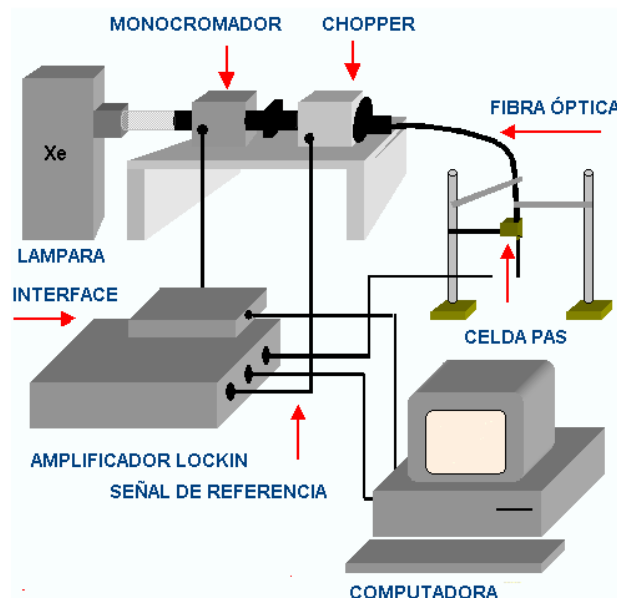


Figura 2.5 Arreglo experimental

Las bondades de esta técnica han permitido la aplicación de la misma en diversas ramas, por ejemplo en el estudio de reacciones fotoquímicas, en la caracterización de diversos materiales

sólidos como en la caracterización del ancho de banda de los niveles en semi- conductores; el estudio de vidrios dopados con iones metálicos y el monitoreo de procesos de corrosión. En cuanto a sus aplicaciones en estudios biológicos, también ha sido ampliamente utilizada desde estudios en tejidos humanos hasta la investigación de diversos procesos en plantas.

2.3 Estudio histológico. [4, 5, 6, 7]

Dos son los grandes problemas que se tienen al hacer estudios histológicos en hueso:

- Hacer cortes del orden de varias micras y
- Hacer tinciones para su correcta apreciación al microscopio.

Debido a la proporción de calcio que contiene el hueso se endurece de modo considerable. Es necesario entonces, eliminar previamente las sales de calcio. Con este objeto se emplean descalcificadores ácidos (por ejemplo ácido nítrico diluido al 1 %) o agentes quelantes que son compuestos químicos que pueden eliminar un elemento por un mecanismo de sustitución. De esta manera es posible quitarle al tejido óseo todos los elementos minerales y reducir su dureza.

Al suprimirse la parte mineral, el tejido óseo conserva su forma ya que mantiene las estructuras orgánicas y adquiere notable elasticidad. En estas condiciones se puede cortar con un osteotómo.

Posteriormente es necesario llevar a cabo los siguientes pasos antes de observar la muestra al microscopio.

Fijación
Inclusión
Corte
Coloración o tinsión
Montaje

Fijación:

La finalidad es conservar el protoplasma con las menores de alteraciones en relación con la célula viva. Los líquidos fijadores actúan como conservadores, inhiben los cambios autolíticos y el crecimiento bacteriano. Coagulan el protoplasma, y con ello lo hacen insoluble, y endurecen el tejido en forma tal que puede cortarse con facilidad. Es posible conservar carbohidratos y lípidos. Muchos fijadores aumentan la afinidad del protoplasma por ciertos colorantes.

Después de ser descalcificadas las tibias de estudio, el proceso es el siguiente: [8]

- Se colocan en formol al 10 %
- Lavar con agua

Se inicia el proceso de deshidratación, incrementando gradualmente la concentración de alcohol, como se indica en la tabla siguiente:

Tabla 2.1 Concentración de alcohol para el proceso de deshidratación.

CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL	TIEMPO	NÚMERO DE CAMBIOS
[%]	[min]	
50	30	1
60	30	1
70	30	1
80	30	1
90	30	1
96	60	3
100	60	2

- Posteriormente hacer la mezcla de alcohol y xilol al 100 % cada uno.
- El tiempo que deben estar las tibias en esta solución es de 1 hora.

Después de que se ha deshidratado el tejido, por medio de diferentes concentraciones de alcohol, el siguiente paso es la aclaración. Los agentes de aclaración incluyen xilol, cloroformo y aceite de cedro. (Se coloca el tejido en xilol en 1 h, En esta etapa se deben hacer dos cambios cada uno de 1 hora.). Después de la aclaración el tejido sigue la inclusión.

Inclusión:

- Finalmente se colocan las tibias en moldes y cubren con parafina. También se usa algún tipo de resina acrílica, con su respectiva identificación.

Coloración o tinción:

Al aplicar algún tipo de tinción, es posible destacar el contraste natural y hacer más patentes varias células, componentes tisulares y material extrínseco. Se emplean muchos colorantes en solución acuosa.

Para poder apreciar las estructuras óseas de manera diferenciada, es necesario disponer de alguna técnica de tinción, así como de un tipo de iluminación especial, en algunos casos es necesario disponer de luz polarizada.

Generalmente la técnica histológica a la cual recurren los patólogos en primera instancia es la de Hematoxilina Eosina, posteriormente, dependiendo del interés por descubrir determinadas estructuras, es la decisión que toman por cambiar la técnica. Por ejemplo si se desea conocer el avance de la mineralización es posible tomar en cuenta Von Kossa, o bien alguna técnica de tipo histomorfométrica [9], en la cual es posible conocer concentraciones de minerales específicos tales como aluminio, velocidad de concentración mineral, velocidad de formación ósea, entre muchas posibles variables que se pueden estudiar en la osteogénesis.

Montaje:

Después de la coloración se quita el exceso de colorante al lavar el corte con agua o alcohol, según el solvente del colorante, y se deshidrata el mismo con alcohol con concentraciones crecientes. Es en esta etapa final donde se fijan las muestras que se desean observar en laminas de vidrio (portaobjetos), posteriormente se cubren con otra lamina de vidrio (cubreobjeto) y se dejan secar. El siguiente paso es pasar las láminas al microscopio para su observación.

2.4 Estudio de microscopía electrónica.

Con este análisis es posible obtener microfotografías del trazo de la fractura, así como conocer que elementos de la tabla periódica están presentes, y su porcentaje en peso molecular.

Para este estudio se dispone principalmente de un microscopio electrónico de barrido (MEB), del cual se hace una breve descripción [10], así como de la forma en la cual se preparan las muestras para su observación.



Figura 2.6 Microscopio electrónico de barrido. a) Se muestra el equipo completo, b) detalle del cañón óptico, la flecha indica la cámara donde se colocan las muestras que se desean estudiar.

El microscopio electrónico de barrido proporciona imágenes y datos físico-químicos de la superficie de cuerpos opacos a los electrones, por medio de un haz delgado de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que captan las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en el proceso de imágenes. Para realizar estas funciones los MEB cuentan con las siguientes partes:

- a) Óptica electrónica
- b) Cámara del espécimen
- c) Circuitos de alimentación de generación de alto voltaje y de producción de barrido
- d) Detectores de electrones secundarios emitidos por la muestra, de electrones retrodispersados y otros tipos de detectores
- e) Dispositivos de observación y registro de las imágenes.

La óptica electrónica está formada por un cañón electrónico, por los dispositivos de barrido y por lentes electromagnéticas condensadoras. Las funciones del cañón son:

- Acelerar y generar electrones y
- Actuar como lente convergente que enfoca el haz formado por una pequeña imagen de la región emisora. En la mayoría de los MEB actuales el cátodo está formado por un filamento de tungsteno calentado que emite electrones por efecto termoiónico.

La cámara del espécimen es muy amplia para dar cabida a objetos de varios centímetros y está situada en la parte inferior de la columna de óptica electrónica. La cámara del objeto cuenta con un soporte para la muestra. Como el MEB explora únicamente la superficie superior del objeto, el soporte de la muestra no tiene que permitir el paso de electrones y está formado por una plataforma metálica móvil. Los movimientos de esta platina deben permitir exponer el haz, que incide verticalmente, en todas las posibles direcciones de la superficie. Por ello la platina no sólo se mueve de forma semejante a la de los microscopios de luz en dos ejes perpendiculares al haz, también es posible acercarse y alejarse del haz. La platina de soporte del objeto está siempre en conexión directa o, a través de una resistencia, con la masa metálica del aparato y por lo tanto está a tierra.

Los detectores más comunes en el estudio de muestras biológicas son:

- De electrones secundarios emitidos por la muestra
- Los electrones del haz retrodispersados por la muestra
- Los de rayos X emitidos por la muestra
- De electrones transmitidos por la cara contraria a la irradiada por el haz
- De cátodo luminiscencia

Un diagrama a bloques, que ilustra el funcionamiento de un MEB, es el de la figura siguiente:

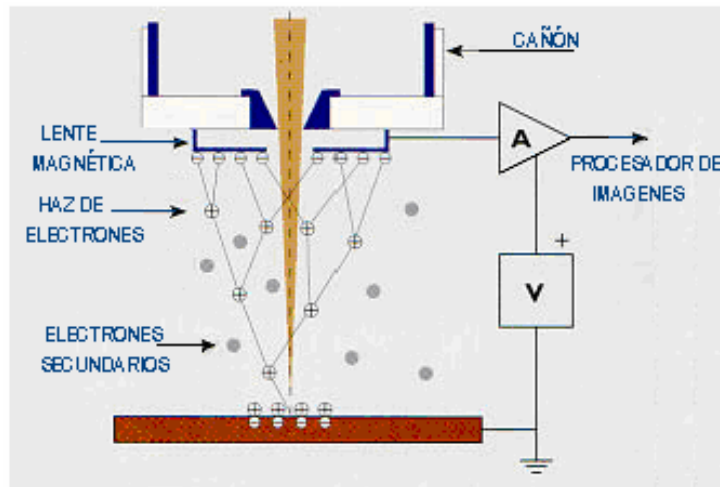


Figura 2.7 Diagrama a bloques del microscopio electrónico (SEM) indicando sus partes.

Debido a que este equipo cuenta con un dispositivo para detectar rayos X (EDS) dispersados, es posible determinar porcentajes de la concentración de cualquier elemento de la tabla periódica, con excepción del hidrógeno. Debido al costo de cada estudio, solamente es posible determinar los siguientes elementos:

- Sodio
- Magnesio
- Fósforo
- Silicio
- Cloro
- Potasio
- Calcio
- Hierro

al comparar los espectros de los elementos analizados en el trazo del callo óseo, con respecto a otros que el equipo tiene en su base de datos del sistema de cómputo.

Las imágenes se forman en el SEM por un mecanismo muy diferente al del microscopio óptico. En el SEM la imagen se forma mediante un tubo de rayos catódicos (CRT) sincronizado con una sonda de electrones, la cual barre la superficie de un objeto: este haz fino de electrones es enfocado hacia un punto de la muestra, lo que provoca la emisión de electrones (con una dispersión amplia de energía) de ese punto de la superficie. Los electrones emitidos son capturados y la señal es amplificada. De esta forma un punto de la imagen es formado ahí. Para construir una imagen completa, el haz de electrones en el microscopio es barrido sobre un área de la superficie de la muestra. La imagen formada en el CRT es por tanto, un mapa de las intensidades de emisión de los electrones de la superficie de la muestra.

El microscopio electrónico de barrido, está frecuentemente equipado con un espectrómetro capaz

de detectar los rayos X emitidos por la muestra durante la excitación con un haz de electrones. Estos rayos X tienen una energía y longitud de onda que es característica de los átomos que componen la muestra, así al ser medidas revelan la composición elemental de la muestra. A diferencia de otras técnicas, el análisis por rayos x puede realizarse en una variedad de tipos de muestras, conteniendo elementos que cubren una amplia porción de la tabla periódica, sin embargo existen ciertas limitaciones de esta técnica, tales como la incapacidad de analizar elementos ligeros (por ejemplo C, N, O) bajo condiciones de laboratorio típicas, eliminando por el mismo el análisis de varios compuestos inorgánicos o del estado sólido iónico del elemento detectado.

RESUMEN

En la siguiente tabla se mencionan tanto los estudios que se efectuarán como las variables que se espera obtener.

ESTUDIO	VARIABLES
BIOMECÁNICO	<ul style="list-style-type: none"> - Energía de deformación - Fuerza de deformación - Rigidez
FOTOACÚSTICO	<ul style="list-style-type: none"> - Espectro de absorción óptica
MICROSCOPIA ELECTRONICA	<ul style="list-style-type: none"> - Microfotografías y - Determinación de elementos
HISTOLÓGICO	<ul style="list-style-type: none"> - Grosor del callo óseo - Formación de vasos sanguíneos - Formación osteoíde - Restauración ósea completa - Presencia de tejido conectivo, que puede ser: laxo o denso - Presencia de osteoblastos - Tejido de granulación
BIOQUÍMICO	<ul style="list-style-type: none"> - Densidad de fosfatasa alcalina en suero

REFERENCIAS

1. Timoshenko S, Gleason H. MacCullough, Elements of strength of materials, D. Van Nostrand Company, 1961, 101-103
2. Allan Rosenzweig, Allen Gersho, Theory of the photoacoustic effect with solids, Journal of Applied Physics, 1976, 47, 1, 64- 69
3. Biophysics, Walter Hoppe, Wolfgang Lehmann, Hubert Markl, Huebert Ziegler, Springer-Verlag, 1983, 101
4. Universidad Nacional Autónoma de México, 2000, 92-110
5. Finn Geneser, Histología, Panamericana, 2000, 19-50
6. Ma Antonieta Rebollo, Histología, Intermedica, 1973, 194
7. Gartner P. Leslie, Histología texto y atlas, Mc Graw Hill-Interamericana, 1997, 1-3
8. Mary Franci, Gridley, Manual of histology and staining technics, 1957, Armed Forces Institute of Patology-Washington D.C.
9. Francisco Velázquez Forero, La biopsia ósea metabólica en pediatría, Boletín Med Hosp. Infant M, 2002, 59, 183-197
10. Gerardo Vázquez N., Olga Echeverría, Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas, Fondo de Cultura Económica, 92-110

CAPÍTULO 3



**LA LUZ EN LOS TEJIDOS, E INTRODUCCIÓN A
LOS LÁSERES.**

Se analizan las propiedades ópticas de los tejidos, así como la interacción de la luz con las células, en el proceso de la consolidación ósea. Finalmente, se da una introducción a los aspectos teóricos fundamentales del láser.

CAPÍTULO 3

LA LUZ EN LOS TEJIDOS E INTRODUCCIÓN A LOS LÁSERES.

3.1 Propiedades ópticas de los tejidos. [1, 2, 3, 4]

Los tejidos biológicos, tienen una ventana de absorción bien definida en el espectro electromagnético, que los identifica y diferencia óptimamente unos de otros.

La hemoglobina, a diferencia del agua y la grasa, cambia en función de la concentración de oxígeno, lo que depende del metabolismo del tejido. Entonces, los correspondientes cambios en absorción pueden proveer información fisiológica clínicamente útil.

En el espectro ultravioleta UV-A, visible o infrarrojo cercano, los tejidos son normalmente sujetos a dispersión anisotrópica caracterizada por una dirección de propagación de los fotones, con una simple dispersión, la cual puede ser debida a la presencia de grandes organelos celulares (mitocondria, lisosomas, y membranas internas aparato de Golgi)

Los tejidos orgánicos son ópticamente inhomogéneos, su índice de refracción es, en promedio, mayor que el del aire. Esto se toma en cuenta en la reflexión parcial de la radiación en los tejidos y en la interfase aire-tejido (reflexión de Fresnel), mientras la radiación restante logra penetrar en el tejido. Múltiples dispersiones y absorciones ocurren, dando como consecuencia un incremento en el diámetro del haz de luz, con lo que decae su trayectoria, un volumen cada vez mayor se incrementa y da lugar a una dispersión de la radiación en sentido contrario a la dirección del haz aplicado. Del espectro electromagnético absorben una fracción, muy pequeña y bien definida, que se conoce como ventana de absorción y es función de varios parámetros (Entre ellos el pigmento del tejido, el grado de rugosidad, la densidad de agua contenida). Esta ventana de absorción está en el rango de 0.1 a 1.5 μm y se muestra en las figuras 3.1, 3.2 y 3.3

Pueden existir considerables diferencias entre los coeficientes medidos *in vitro* e *in vivo*, debido a mantener las muestras de los tejidos:

En solución salina, lo que incrementa su reflexión.

Expuestas a grandes cambios de temperatura, ya sea que se congelen o bien que se dejen secar.

Sin la epidermis y al deformar las muestras mientras se estudian.

Se debe tener cuidado en procedimientos de calibración y medición, esto puede introducir errores al determinar los valores de reflectancia difusa y transmitancia total.

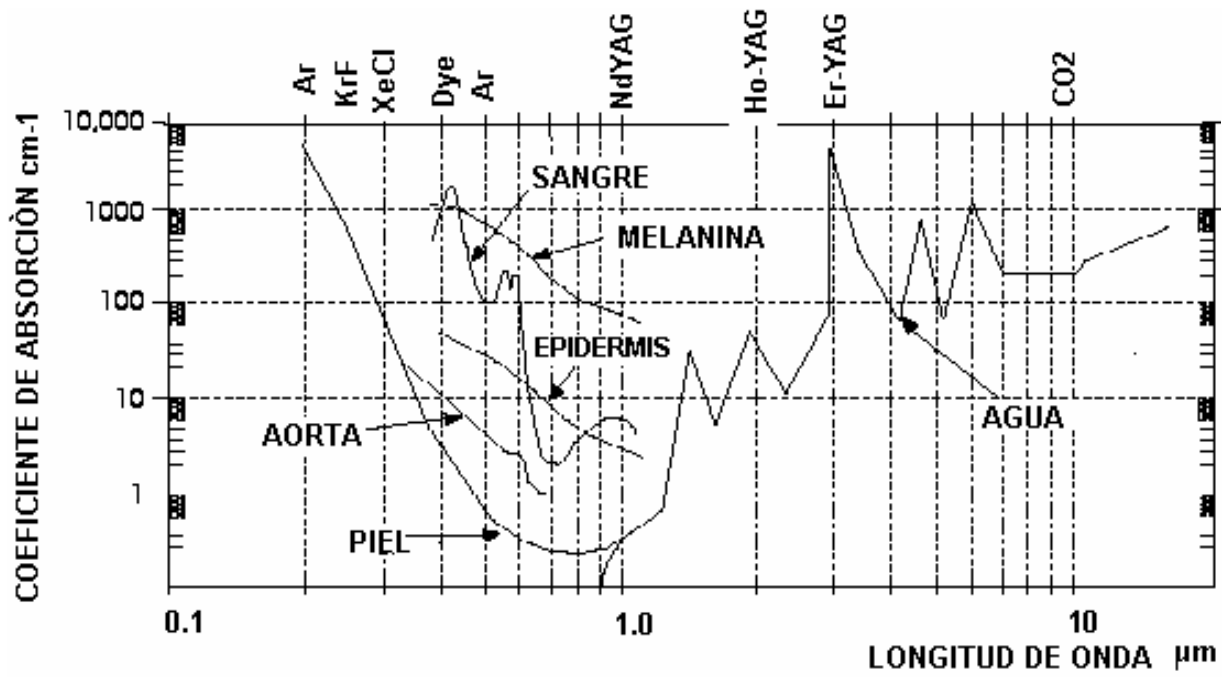


Figura 3.1 Coeficientes de absorción de los tejidos.

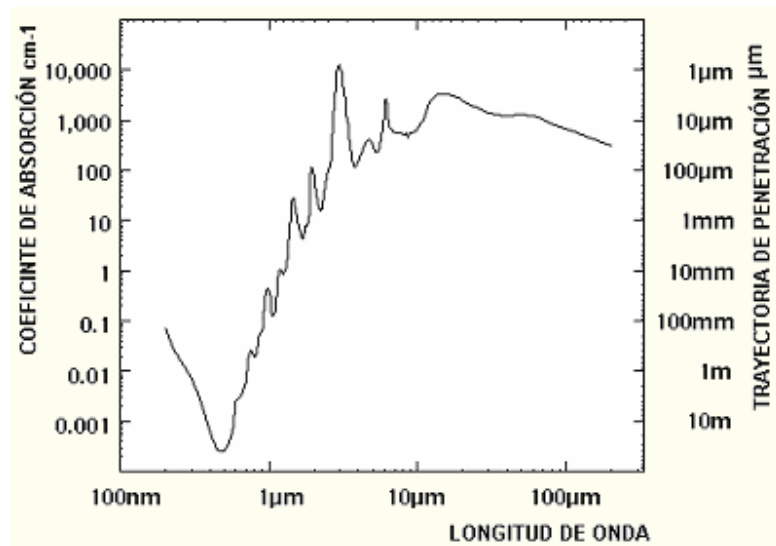


Figura 3.2 Espectro de absorción del agua.

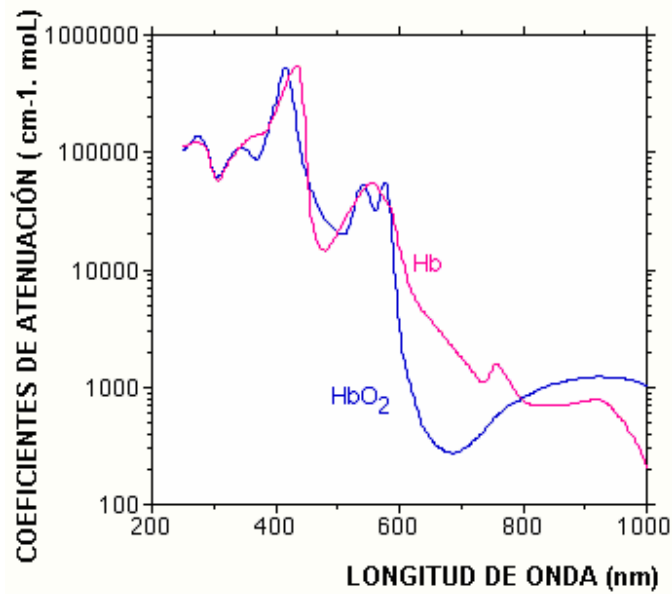


Figura 3.3 Espectro de absorción de la hemoglobina. [4]

— **Hemoglobina**, Hemoglobina transportando oxígeno —

Debido a un proceso evolutivo, la piel humana ha desarrollado mecanismos ópticos y químicos para protegerse de la radiación electromagnética, en particular de la ultravioleta (UV). La piel es la primera barrera contra este tipo de radiación y es el sitio de muchas reacciones fotoquímicas. En el rango ultravioleta la mayor parte de esta radiación es impedida a continuar a subcapas internas e interactúa con biomoléculas en la piel y vasos cutáneos.

La piel está constituida por capas, como se muestra en la figura 3.4 y cada una de ellas tiene un comportamiento óptico bien definido, así, se pueden mencionar las siguientes capas:

- *Estratum corneum*
- Epidermis
- Dermis
- Grasa subcutánea

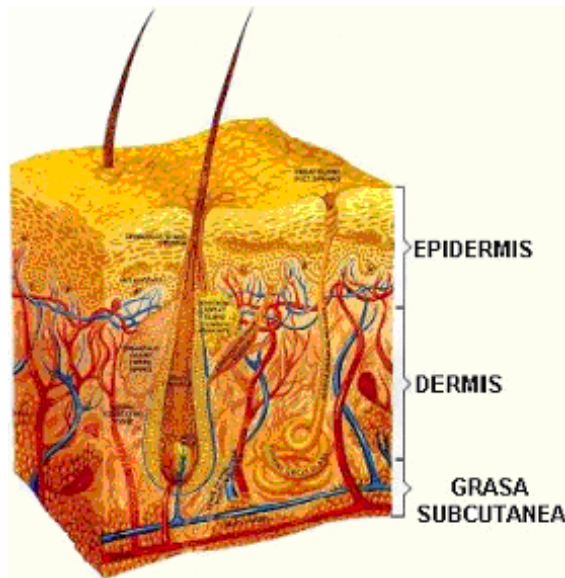


Figura 3.4 Estructuras de la piel humana. [5]

Estratum corneum.

Esta capa está constituida por capas de grasa, células muertas con queratina (fibras protectoras de la piel) y lípidos que constituyen la capa más superficial de la epidermis y por lo tanto, de la piel. Esta estructura actúa como un difusor óptico debido a su superficie normalmente rugosa, de forma semejante a los difusores de acrílico que se colocan a los tubos fluorescentes. La primera interacción de la luz ocurre aquí, donde cerca del 5-7 % de la radiación incidente es reflejada hacia atrás, (hacia la superficie).

Epidermis.

Esta actúa como un filtro óptico, cuyos cromóforos (estructuras orgánicas que absorben de forma selectiva la luz, por ejemplo: en la región del ultravioleta A, azul y amarillo, el cromóforo puede ser: hemoglobina. En la región del ultra violeta C y B, los cromóforos pueden ser: proteínas, ácido urocánico, melanina ácido nucleico), el espesor es determinado tanto por factores genéticos como por la acción del medio ambiente, los cuales modifican el espesor, las fibras y la dispersión de la luz a la dermis. El principal cromóforo es la melanina, una proteína compleja macromolecular derivada de la tirosina, la cual absorbe fuertemente la luz visible y UV. Los melanocitos interactúan con los queratinocitos y facilitan la transferencia de melanina a la superficie y finalmente algo de melanina es depositada en el *estratum corneum*, en gránulos llamados melanosomas. Proporcionan protección contra daño actínico a la piel y a quemaduras por el sol.

La mayor absorción de la epidermis y el *estratum corneum*, de longitudes de onda menores a 220 nm, es debida principalmente a cadenas de péptidos. El contenido de melanina y su distribución juega un papel importante al determinar la transmisión epidermal de la radiación óptica. De todo el espectro, desde UV hasta el infrarrojo cercano, la melanina tiene su mayor

absorción en longitudes de onda cercanas a 1200 nm, como resultado de su estructura polimérica cromofórica.

La absorción de la luz reemitida por cromóforos tales como hemoglobina, o melanina, da a la piel su color. Análisis espectrales detallados pueden dar información acerca de los tejidos, concentración de sangre en los tejidos, concentración de bilirrubina o de algunas drogas. Así mismo, el cáncer de piel está relacionado inversamente con la cantidad de melanina presente.

Dermis.

Es principalmente una mezcla semisólida de fibras, agua y gel viscoso, llamada sustancia basal. Consiste de agua y mucopolisacáridos.

Hay tres tipos de fibras presentes en esta subcapa:

Colágeno

Reticulum y

Elástica.

El colágeno constituye aproximadamente el 70 % del peso en seco de la dermis, es una gran molécula de tejido constituida por fibrillas. La dispersión óptica, por fibras de colágena inmersas en la capa basal de tejido, determina la trayectoria de penetración en el tejido conectivo. Longitudes de onda corta son dispersadas mucho más que las largas y su penetración es menor. En resumen, en la radiación UV un número grande de moléculas absorben esta radiación. Por ejemplo, en la piel, aún con ausencia de melanina, las longitudes de onda relativamente cortas, cercanas a 320 nm, alcanzan los vasos cutáneos, en la dermis.

Debido a una reemisión de la luz, por sustratos de la sangre, se tiene una componente del color correspondiente a esa longitud de onda en la piel. La sangre absorbe fuertemente las longitudes correspondientes al azul y al verde.

Las longitudes de onda corta en el espectro visible, pueden penetrar tan profundo como 0.5-2.5 mm, posteriormente decae la intensidad de la luz conforme a la razón $1/e$. En este caso, la dispersión y absorción ocurren con 15-40 % de la intensidad de la luz incidente que es reflejada. En el rango de 0.6 - 1.5 μm la dispersión es mayor que la absorción y la luz penetra hasta 8-10 mm. Simultáneamente, la intensidad de la luz reflejada se incrementa de 35-70 % de la luz incidente, debido a una dispersión hacia atrás.

La piel se comporta como un filtro pasa altas, es decir, deja un paso casi libre para longitudes de onda larga (infrarroja cercano) y para longitudes de onda de alta energía, como puede ser la ultravioleta en la región C (del orden de 300 nm, y aún menores). La principal razón para usar fuentes de radiación en la región roja e infrarroja, en aplicaciones terapéuticas, es el hecho de que la hemoglobina no absorbe en estas últimas longitudes de onda y es posible alcanzar grandes profundidades en tejido vivo.

Los tejidos sólidos tales como costillas y cráneo, absorben fácilmente longitudes de onda en el visible e infrarrojo cercano.

La alteración de ciertas bases en el ADN han recibido mucha atención debido a su importancia en la regulación celular y replicación, la presencia de secuencias genéticas no redundantes y la relativa estabilidad de algunos de los productos del ADN. Sin embargo, muchos otros cambios fotoquímicos también ocurren afectando el RNA. Algunas de esas alteraciones pueden tener poca importancia, otras pueden cambiar la función celular, o conducir a la liberación de productos químicos que pueden afectar células o tejidos adyacentes.

Un beneficio de los efectos de la radiación UV al incidir en la piel, es el cambio de 7-dehidrocolesterol a vitamina D₃, lo que sucede en dos pasos: Primero la 7-dehidrocolesterol absorbe radiación en longitudes de onda más cortas que 320 nm, y cambia a D₃. Esta reacción ocurre a través de la epidermis. Enseguida, la previtamina D₃, térmicamente se isomeriza al formar vitamina D₃, la que en forma selectiva se une a la vitamina D, separándola en los capilares. La vitamina D es de gran importancia en la fijación de calcio en los huesos, de aquí que sea de gran importancia saber que es necesaria la exposición al sol, pero con moderación.

Al ser absorbida la radiación electromagnética por los tejidos, hay múltiples dispersiones debido a eritrocitos y micro vasos, entonces la reología de la sangre y la distribución de micro vasos, influye marcadamente en la distribución final de la energía láser. Es claro que los cambios fotobiológicos no necesariamente ocurren bajo la influencia de radiación láser monocromática coherente.

Farrar [2] en 1999 publica un trabajo de caracterización de las propiedades ópticas de un hueso trabecular. (Tabla 3.1) Para este experimento se dispuso de una esfera de un espectrofotómetro integrador. Se menciona que al aplicar luz láser de argón (514.5 nm), y luz de un diodo láser de 810 nm, a un hueso trabecular, se encuentran los siguientes resultados.

Los aspectos ópticos y mecánicos no están separados en los tejidos orgánicos, como lo demuestra Chan y cols. [3]. Ellos realizaron experimentos *in vitro*, con piel humana (de dos donadores hispanos y tres caucásicos) para determinar sus propiedades ópticas como función de la presión. Cada muestra se sometió a compresión por medio de un sistema de resortes y placas. La reflexión y la transmisión de cada muestra se midieron con y sin carga, de aproximadamente 0.1 a 1 kg/cm². Bajo compresión el espesor de los tejidos se redujo hasta un 78 % .

De lo anterior se encontró que la reflexión decrece mientras la transmisión se incrementa bajo compresión. Los coeficientes de absorción y dispersión, con respecto al grupo control sin carga, presentaron un incremento.

Tabla 3.1 Coeficientes de absorción y dispersión para hueso trabecular, en función de las

longitudes de onda de 514 y 830 nm (visible e infrarrojo cercano respectivamente). [2]

	LONGITUD DE ONDA 514 nm	LONGITUD DE ONDA 810 nm
COEF. ABSORCIÓN [cm] ⁻¹	4.89 ± 1.95	0.0874 ± 1.11
COEF. DISPERSIÓN [cm] ⁻¹	141.2 ± 15.8	94.44 ± 15.03
TRAYECTORÍA 1/e ALCANZADA [μm]	69	106

Entre las principales propiedades ópticas de los tejidos se tiene: la absorción y dispersión característica de cada tejido. La absorción de la radiación electromagnética es definida, por el coeficiente de absorción, de acuerdo a la ley de Beer-Lambert: [4]

$$I = I_0 e^{-\mu \sigma_a x}$$

Donde:

I = es la intensidad de la luz incidente

I_0 = es la intensidad de la luz transmitida

El coeficiente de absorción, puede ser expresado como $\mu_a = \rho \sigma_a$

Donde:

ρ = la densidad de la partícula

σ_a = la sección transversal de la zona de absorción de la radiación.

El recíproco $1/\mu_a$ es conocido como la trayectoria libre de absorción y es igual a la trayectoria libre de un fotón entre eventos consecutivos de absorción.

El coeficiente de absorción es definido de forma tal que, cuando un fotón se propaga una distancia dx , la probabilidad de absorción, es:

$$\mu_a dx$$

La trayectoria de penetración depende mucho del tipo de tejido, por ejemplo, el tejido adiposo es mucho más transparente que el músculo, principalmente debido al poco contenido de hemoglobina. Es posible aumentar la trayectoria de penetración, si al momento de aplicar el láser se hace una ligera presión en el sitio de aplicación.

La dispersión es una consecuencia del ensamble de las distintas capas de tejidos con diferentes índices de refracción, desde la piel hasta el hueso y es definida de acuerdo a la ley de Beer-Lambert por:

$$I = I_0 e^{-\mu_a s x}$$

Donde:

I = es la intensidad de la luz incidente

I_0 = es la intensidad de la luz dispersada

La probabilidad de dispersión en una distancia infinita es: $\mu_s dx$, y la trayectoria libre para un evento de dispersión es aproximadamente $1/\mu_s$

3.2 Interacción de la luz en los tejidos.

Una onda electromagnética es una onda que tiene una componente eléctrica y otra magnética, como son las ondas de radio, de televisión, los rayos X, la luz del sol, la que proporciona cualquier lámpara, o el ruido (interferencia) que se genera al encender un motor eléctrico, como se presenta en la figura siguiente.

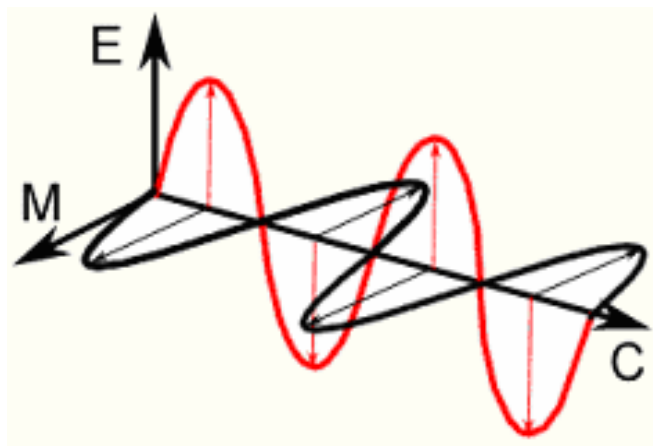


Figura 3.5 Onda electromagnética, en el plano cartesiano.

Al rango completo de todas las ondas electromagnéticas se le conoce como espectro electromagnético y abarca desde longitudes de onda corta, como son los rayos gama, hasta las ondas de radio, que están comprendidas en longitudes de onda larga, como se muestra en la figura 3.6.

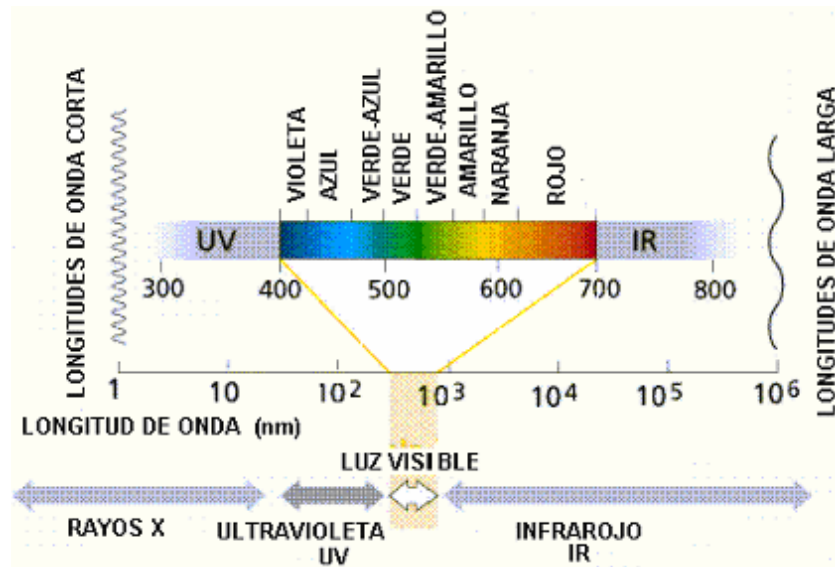


Figura 3.6 Espectro electromagnético.

Un rayo de luz colimada (luz que se hace coincidir en un punto, en forma semejante a lo que sucede al colocar una lente convergente entre la luz del sol y un papel. Se nota en el papel un punto brillante, esa es una muestra de luz colimada) en un biotexido se difunde de acuerdo a: [6]

$$I(z) = (1-R) I_0 \exp^{-\mu_t x}$$

Donde:

I_0 = intensidad de la luz incidente.

$\mu_t = \mu_a + \mu_s$ es el coeficiente de atenuación total

μ_a = coeficiente de absorción

μ_s = coeficiente de dispersión

x = espesor de la muestra

R = coeficiente de reflexión de Fresnel para un rayo de incidencia normal. Se puede calcular de:

$$R = \left[\frac{n-1}{n+1} \right]^2$$

Donde:

n = es el índice de refracción del tejido donde incide la luz.

La radiancia a su vez es definida como el flujo de energía por unidad de área, [W/cm²].

Algunas veces es llamada intensidad específica, o bien simplemente intensidad I .

Al tomar en cuenta unidades adimensionales, la propagación de la luz en un medio cualquiera, depende de tres parámetros:

- El albedo
- La trayectoria óptica o espesor τ y
- La función de fase.

El albedo a es un parámetro adimensional y está definido como la razón del coeficiente de dispersión, al coeficiente de atenuación total: [7, 8]

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_s + \mu_a}$$

El albedo varia entre cero y uno. Un valor de cero indica que no hay dispersión, en tanto que un valor de uno, indica que el tejido no absorbe luz.

La trayectoria óptica τ es el producto del espesor del tejido y el coeficiente de atenuación total μ_t .

Una trayectoria óptica con valor uno, indica que hay la probabilidad $e^{-1} = 37\%$, de que la luz viaje al menos esa distancia sin ser absorbida o dispersada:

La función de fase $p(\hat{s}, s)$ describe la cantidad de luz dispersada, desde la dirección denotada por el vector unitario \hat{s} , a la dirección s . Hay varias formas en las cuales la función de fase puede ser normalizada, sin embargo, al considerarla como una función de distribución de probabilidad, resulta ser la función más simple. En este caso la condición de normalización requiere que la integral de la función de fase en todos los ángulos, sea igual a uno.

$$\int_{4\pi} p(\hat{s}', s) d\omega = 1$$

Donde:

$d\omega$ es la diferencial del ángulo sólido en la dirección \hat{s} .

La función de fase es una descripción únicamente de la distribución de la dispersión de la partícula. Entonces $p(\hat{s}, s)d\omega$ es la probabilidad de que un fotón incidente en la dirección \hat{s} , cambie su trayectoria del ángulo sólido, unitario, en la dirección s . Esta función difiere en general de partícula a partícula. Por simplicidad se elige una función de fase promedio, que describa las más importantes características del proceso de dispersión. Esta función es generalmente dependiente del ángulo de dispersión, de esta forma se tiene:

$$p(\hat{s}, s) = p(\cos\theta)$$

La función más simple de fase, para el caso isotrópico es:

$$p(s',s) = \frac{1}{4\pi}$$

El factor $1/4\pi$ resulta de la condición de normalización y del hecho de que hay 4π estereoradianes en un círculo completo. La función de fase tiene unidades sr^{-1} .

Si la función de fase no es isotrópica, entonces se toma en cuenta la función llamada, el coseno del ángulo promedio y es usada para determinar el grado de anisotropía de la función de fase. Este parámetro muchas veces es denotado por g y es definido por la integral, sobre todos los ángulos, multiplicada por el coseno del ángulo.

$$g = \int_{4\pi} p(s',s)\cos(\theta) d\varpi$$

El coseno promedio de la función de fase g , es una medida de la cantidad de luz que es dispersada hacia adelante [9, 10, 11, 12]. La anisotropía puede tener cualquier valor entre -1 y 1 . Así, se tienen los siguientes casos extremos:

$g = -1$ dispersión total hacia atrás.

$g = 0$ dispersión isotrópica.

$g = 1$ la dispersión es total hacia adelante.

Los posibles tipos de interacción que pueden ocurrir, al incidir la luz en los tejidos son [9, 10]:

- fotoquímica
- electromecánica y
- térmica.

Dependen de la longitud de onda, intensidad de la luz aplicada, contenido de agua, tiempo de exposición, cantidad de agua contenida en los mismos, atmósfera en la cual se aplique la luz, geometría del haz, modo de operación y coeficientes de absorción y dispersión, entre los más importantes parámetros que han de tomarse en cuenta en una aplicación determinada.

Al incidir la luz en la piel, es dispersada y absorbida por sus distintas capas, así como por la grasa subcutánea. Parte de esta luz regresa a la superficie después de múltiples dispersiones, el resto es absorbida y/o transmitida. Bajo esta circunstancia, algunos de los fenómenos ópticos que pueden suceder son los siguientes: [13, 14]

La absorción óptica es característica de cada material y depende de la trayectoria máxima, que un haz de luz puede alcanzar para una longitud de onda determinada. Esta absorción está determinada por un coeficiente que se conoce como coeficiente de absorción.

La refracción directa es una consecuencia de la ley de Snell y es definida de acuerdo a la relación [15]:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

La dispersión es debida a la discontinuidad de los índices de refracción a nivel microscópico, de los elementos que constituyen un tejido y puede ser de dos tipos:

- dispersión directa
- dispersión de rebote

La dispersión directa, es debida a la discontinuidad de los índices de refracción de las distintas capas que constituyen un tejido. En este caso, la luz se dispersa pero en dirección hacia adelante.

La dispersión de rebote, es caracterizada como la luz que se dirige en todas direcciones hacia afuera del tejido, como consecuencia de múltiples rebotes en las subcapas más inferiores.

3.2.1 Efectos al incidir la luz en los tejidos. [16, 17, 18]

Los efectos más conocidos son:

Fotoquímicos

Electromecánicos

Térmicos

Efectos fotoquímicos.

Al aplicar potencias del orden de 30 mW es posible inducir efectos estimulantes en los tejidos. La estimulación láser normalmente se establece en el rango de 0.5 a 10 J/cm² con lo que es posible estimular la síntesis de ADN, activar complejos enzimáticos, transformar prostaglandinas y producir efectos de micro circulación. [19]

Efectos electromecánicos. [20]

Sucedan debido a que una longitud de onda particular de luz láser no es absorbida uniformemente en el tejido, ya que algunos átomos son más sensibles a la luz láser que otros, lo que hace que se incremente la energía de sus niveles. La energía concentrada es conducida a formar esfuerzos y a la ionización de esos estados atómicos energizados. Las células en la trayectoria de la onda de choque, que se propaga a la velocidad del sonido, son mecánicamente fragmentadas.

Este tipo de interacción requiere altas densidades de potencia, del orden de 10⁹ a 1,012 W/cm², con pulsos cortos y densidades de energía del orden de 100 J/cm², así como campos eléctricos del orden de 100 V/cm, que son comparables a los campos eléctricos atómicos o intermoleculares. Esto induce a la ruptura dieléctrica en los tejidos, resultando en un

microplasma, o volumen ionizado con un gran número de electrones. Una ruptura mecánica, localizada de tejido, ocurre debido a la onda de choque asociada con la expansión del plasma.

Efectos térmicos: [21]

Al decrecer el tiempo de interacción y aumentar la densidad de potencia, se inducen efectos foto térmicos. La principal aplicación es la conversión de luz a calor.

Al presentarse este efecto lo que sucede es que, al absorber energía se genera un estado vibracional excitado de las moléculas y entonces las colisiones elásticas con las moléculas vecinas, dan como resultado un incremento en su energía cinética, lo que conduce a una elevación de la temperatura.

Tanto la estructura, como la función de las células vivas, son determinadas por una amplia variedad de proteínas. Esas estructuras moleculares son térmicamente estables a la temperatura del cuerpo. Al elevar la temperatura de los tejidos a 60 °C, o más, las macromoléculas son enérgicamente activadas y una transición hacia la desnaturalización ocurre. Consecuentemente, una molécula de proteína, pierde su arreglo espacial y su función en la célula. Posteriormente, enzimas termo labiles (inestables térmicamente) tienen una reacción en el tejido, a lo cual sigue la necrosis. En la figura 3.7 se describe la forma en la cual dependen tanto el tiempo de exposición, como la densidad de energía para obtener los efectos antes mencionados.

3.3 Mecanismos de interacción de la luz con las células en el proceso de la consolidación ósea.

Una vez que la luz es capturada por los fotorreceptores, suceden diversos eventos, que tienen un impacto a diferentes niveles, como se indica en seguida:

- A nivel de tejido.
- A nivel celular.
- A nivel molecular.

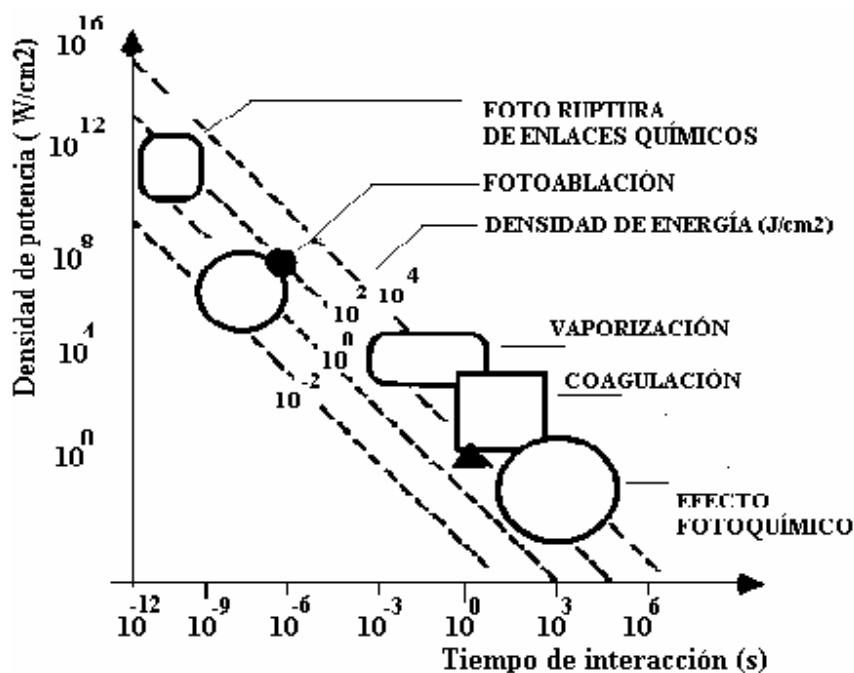


Figura 3.7 Diagrama de la interacción densidad de potencia-tiempo. [13]

3.3.1 A nivel de tejido:

Esta demostrado que los efectos del láser *in vivo* e *in vitro* causan cambios en la acción de los potenciales de los nervios, en la velocidad de conducción, en la latencia distal de los nervios y la función simpática nerviosa. Este es uno de los mecanismos disponibles para alterar el umbral del dolor, en situaciones experimentales.

3.3.2 A nivel celular.

La radiación roja e infrarroja induce rotación y vibración de las moléculas en la membrana celular y el efecto de la luz coherente e incoherente es el mismo. De esta manera es posible activar los canales de calcio. Es la fotoactivación de enzimas, la que permite que un fotón, pueda activar una molécula de una enzima, la cual en cambio puede procesar cientos de moléculas sustratos, las cuales proveen un modelo teórico para una pequeña cantidad de energía (láser) al inducir un significativo efecto fisiológico. Un incremento de la replicación de mRNA es visto en condiciones experimentales en líneas celulares expuestas a radiación láser. La respuesta de los fibroblastos a heridas y úlceras, al láser ha de ser estudiada con aparentes aplicaciones clínicas del láser en la consolidación. La respuesta de macrófagos también se ve incrementada. [22, 23]

3.3.3 A nivel molecular. [24, 25]

Una explicación clara de la estimulación con láser no se tiene sin embargo existen teorías que tratan de explicar este fenómeno. Estas teorías se pueden dividir en dos categorías:

- 1.- Hipótesis basada en la idea de una acción específica de radiación coherente (láser) en tejidos de animales y humano, estructuras biológicas, agua, etc.

2.- Hipótesis de la acción fotoquímica del láser, LEDs y otras fuentes de radiación visible e infrarroja.

Kart menciona las siguientes hipótesis que relacionan los mecanismos de acción de la radiación láser:

- Singletes de oxígeno. De acuerdo a la cual la luz absorbida por moléculas tales como porfirinas y flavoproteínas pueden ser cambiadas, por ejemplo, en la cadena respiratoria de la mitocondria hacia derivados que poseen las propiedades de fotosensores.

Al incidir en la célula la radiación monocromática visible e infrarroja, suceden dos reacciones que se conocen como:

- reacciones primarias
- reacciones secundarias.

Reacciones primarias: En esta etapa la luz es capturada por moléculas de la cadena respiratoria, una de ellas la molécula citócromo c oxidasa, la cual se oxida cuando el tejido se irradia, esto implica que el metabolismo se ha incrementado. Esto es causado por una excitación electrónica de componentes de la cadena respiratoria. La radiación causa la excitación y promoción de estados electrónicos, la donación y aceptación de electrones de algunas moléculas (oxidación-reducción y se conoce a esta serie de eventos como REDOX) y consecuentemente el flujo de electrones en la molécula. Este sistema se localiza en el interior de la membrana de la mitocondria). Se supone ser seguidas por una cascada de reacciones secundarias (traducción de foto señales y cadenas de amplificación o señales celulares) ocurriendo en el citoplasma celular, las membranas y núcleos. Se caracterizan por la generación de estados singletes de oxígeno (1O_2) y por la estimulación de la síntesis de RNA y DNA. Esta posibilidad ha de ser considerada por algún tiempo, cuando las células son irradiadas con altas dosis, e intensidades, ya que esto puede bloquear la reacción. [26]

La acción de la luz visible, Tiina Karu la explica en un modelo, de *Entamoeba Coli*, [27] en el cual la luz (fotones) produce cambios fotoquímicos, en fotorreceptores, en la mitocondria (citocromo), porfirinas y membrana de la célula, lo cual altera el metabolismo. Una pequeña cantidad de oxígeno es producida como resultado de la absorción de la luz, dentro de la célula. Esto causa gradientes de protones que cruzan las membranas celulares y de la mitocondria. De esta forma cambia la permeabilidad de la membrana celular de varios iones (por ejemplo, el sodio y el potasio y altera el flujo de calcio en la mitocondria y causa cambios en la permeabilidad de la membrana de la mitocondria), conduciendo a un incremento en los niveles celulares de ATP (adenosin trifosfato). Una manifestación en la actividad de ADN se observa en cambios fisiológicos tales como un incremento en la proliferación endotelial celular, y un incremento en la proliferación de fibroblastos, etc. De esta forma se obtiene una fotorespuesta, es decir una bioactivación.

En el caso de células de mamíferos se tiene que tanto la radiación roja, como infrarroja es capturada por los mismos fotorreceptores. La existencia de un espectro de acción implica, la existencia de trayectorias de señalización, dentro e la célula.

Las reacciones secundarias: Al suspender la irradiación a los tejidos se inicia una cascada

de reacciones de señalización celular.

Incremento de la vascularidad (circulación) al incrementar la formación de nuevos capilares, los cuales adicionan nuevos vasos ó angiogénesis, que reemplazan otros dañados. La velocidad de cambio de nuevos capilares en el proceso de consolidación, al portar más oxígeno, así como más nutrientes para la consolidación y con ello se puede también transportar más nutrientes.

Estimular la producción de colágeno. El colágeno es la proteína más común encontrada en el cuerpo.

Estimula la liberación de adenosin trifosfato, que es el mayor portador de energía a todas las células

La radiación láser de bajo nivel (LLL light low laser, desde el rojo hasta la región infrarroja) tiene aplicaciones terapéuticas en un gran número de situaciones clínicas (por ejemplo en el proceso de la cicatrización de la piel), tratamiento del dolor y medicina del deporte entre otras). Dependiendo de la longitud de onda, la radiación electromagnética, en forma de luz, se pueden estimular las macromoléculas de los tejidos. Se sabe que estas longitudes de onda corresponden con las características de los niveles de absorción de energía de los componentes relevantes de la cadena respiratoria. Esto causa un estímulo directo en la mitocondria y como consecuencia de ello, un incremento de ATP [28]. Sin embargo, las bases foto biológicas de este comportamiento, aún no son totalmente conocidas. Ya que ambas radiaciones, visible e infrarroja, tienen efectos terapéuticos. Pero en la mayoría de los casos, los efectos relativos no son comparables cualitativamente.

Efectos de la terapia láser: [29].

- 1.- Puede incrementar la vascularidad (circulación) al incrementar la formación de nuevos capilares, los cuales son incorporados a vasos sanguíneos, que reemplazan otros dañados. La velocidad con la cual se incrementan nuevos vasos contribuye al proceso de consolidación, al transportar más oxígeno así como nutrientes.
- 2.- Estimula la producción de colágena. Como consecuencia de ello la calidad del tejido cicatrizado aumenta.
- 3.- Se estimula la liberación de ATP
- 4.- Incremento en la actividad del sistema linfático.
- 5.- Incremento de la síntesis de RNA y DNA.
- 6.- Reduce la excitabilidad del tejido nervioso.
- 7.- Estimula la actividad de fibroblastos, la cual ayuda en el proceso de reparación tisular.
- 8.- Incremento de la fagocitosis.

9.- Estimula la granulación y formación del tejido conectivo, los cuales son procesos de consolidación de heridas, úlceras o tejidos inflamados.

3.4 Introducción a los láseres.

En 1917 Albert Einstein da a conocer el principio de la emisión estimulada, el cuál establece que partículas de luz de una frecuencia específica, pueden estimular a los electrones del átomo para emitir energía radiante, en forma de luz de la misma frecuencia que las partículas incidentes. Tomando en cuenta estas experiencias teóricas, los amplificadores y generadores cuánticos (Maseres) fueron descubiertos en 1954 por dos grupos de científicos independientes, unos soviéticos y otros norteamericanos. En el Instituto de Física de la Academia de Ciencias de la URSS "P. N. Lebedev", N. G. Básov y A. M. Prórorov y en los Estados Unidos, en la Universidad de Columbia J. Gordon, J. Tzyger y C. H. Townes. Por este trabajo se les otorgó el premio Nóbel de física en 1964. [30, 31, 32]

En 1960, el fisico estadounidense Theodore Maiman construyó el primer láser, tomando como base un cristal de rubí. Un año más tarde, el fisico estadounidense nacido en Irán, Alí Javan, construyó un láser de helio-neón (HeNe). En esa década C. K. N. Patel desarrolla el primer láser de CO₂. Posteriormente, en 1966, se construye en los Laboratorios Coherent Radiation, el primer láser industrial de CO₂. A partir de este momento hay un incremento considerable, tanto de las investigaciones para desarrollar nuevos láseres, como en sus aplicaciones en diversos campos.

El láser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) es un dispositivo que genera o amplifica radiación coherente, mediante el proceso de emisión estimulada. En un láser típico se distinguen tres partes fundamentales:

- Un medio compuesto de átomos, iones o moléculas, que permiten la generación y amplificación de la luz, el cual se conoce como medio activo.
- Una fuente de energía para excitar el medio llamada fuente de bombeo y
- Un resonador óptico para facilitar la retroalimentación de la luz que se amplifica.

Para que tenga lugar la amplificación de la luz, es necesario que en el medio láser se lleve a cabo un proceso conocido como excitación o generación de inversión de población, el cual consiste en lograr una mayor densidad de partículas en un estado energético superior que en uno inferior, contrario a lo que ocurre en equilibrio termodinámico. Cuando el medio láser se logra excitar, entonces puede suceder algún proceso de emisión electromagnética, es decir, emisión espontánea o emisión estimulada dependiendo de cómo ocurra la desexcitación. Para lograr que una partícula pase de un nivel energético E_1 cualquiera, a otro de mayor energía E_2 , es necesario que la partícula absorba energía mediante algún proceso, como puede ser la interacción con fotones de energía $E = E_2 - E_1$ o bien, una reacción exotérmica que le transfiera energía.

Después de un cierto tiempo, la partícula puede regresar a su estado base, con una probabilidad dada por el coeficiente de emisión espontánea de Einstein, emitiendo un fotón con energía, dada por:

$$E_1 - E_2 = h\nu_{21} = E$$

con una dirección totalmente aleatoria, como sucede por ejemplo con los tubos fluorescentes. A este proceso se le llama emisión espontánea. Cuando un fotón de energía E , choca con una partícula en un estado excitado E , entonces existe la probabilidad de que ésta descienda al estado E_1 y emita un nuevo fotón en fase y en la misma dirección del primer fotón. Esto sucede con una probabilidad determinada por el coeficiente de emisión estimulada de Einstein y es el proceso que aprovecha el láser para su funcionamiento.

Las propiedades características de la luz láser son:

- Monocromaticidad
- Coherencia espacial
- Coherencia temporal
- Alta direccionalidad

La monocromaticidad del láser es debida a que el ancho de las líneas espectrales de emisión, en las cuales funciona el láser es muy estrecho.

La coherencia espacial está asociada con las propiedades transversales a la dirección de propagación de la radiación. Si la luz es una onda plana perfecta, entonces tiene una fase uniforme en el plano perpendicular a la dirección de propagación, de esta manera se tiene una onda espacialmente coherente.

La coherencia temporal es asociada con las frecuencias de la luz a lo largo de la dirección de propagación. El parámetro que caracteriza la coherencia de un haz de luz, es el tiempo que se mantiene en fase un paquete de haces luminosos.

Al ser absorbida la luz láser en los tejidos, suceden múltiples dispersiones debido a la diferencia de índice de refracción entre las distintas estructuras de la sangre en movimiento (reología) y la distribución de micro vasos. De aquí se deduce que, los cambios fotobiológicos no necesariamente ocurren bajo la influencia de radiación láser monocromática coherente.

De acuerdo a las aplicaciones médicas se clasifican en dos tipos de láseres: calientes y fríos (hot and cold) y se distinguen por la potencia máxima que pueden entregar. Los láseres calientes pueden proporcionar potencias desde 1-10 Watt hasta cientos de Watts. Se usan en cirugía debido a que es posible hacer incisiones, y cauterizar al mismo tiempo en forma limpia

Los láseres fríos están en el rango que va desde unos cuantos miliwatts hasta 100 mW (en el rango de 600 a 830 nm aproximadamente). Se usan para propósitos terapéuticos y no siempre se puede disponer en forma pulsada de estos últimos.

Cada láser tiene una longitud de onda característica del medio activo con el cual funciona. Así, se tiene la siguiente tabla que muestra los láseres comerciales más conocidos.

TABLA 3.2 Láseres comerciales más conocidos.

LÁSER	λ (nm)	
ArF (argón – fluor)	193	UV
KrF (kripton – fluoruro)	248	
XeCl	308	
N ₂ (nitrógeno)	337	
XeF (xenón- fluoruro)	351	
HeCd (helio- cadmio)	441.6	AZUL
Ar (argón)	488	
Cobre	510.6	AMARILLO
Ar (argón)	514.5	VERDE
Kripton	521 -531	
KTP	532	
HeNe (verde)	543	
Cobre	578	
HeNe (rojo)	632.8	ROJO
Ruby	694.3	
Alejandrita	755	INFRA ROJO
GaAlAs	830	
GaAlAs	850	
GaAs	905	
Nd: YAG	1320	
Holium: YAG	2100	
Erbium: YAG	2900	
CO	4900-8200	
CO ₂	10,600	

De todos estos tipos de láseres se sabe que, para aplicaciones terapéuticas, los que están en la región infrarroja cercana son los que permiten alcanzar mayores profundidades y por lo

tanto con ellos se puede lograr una interacción que puede alcanzar el hueso. Para los propósitos de este trabajo se usará un diodo láser, con una longitud de onda de 830 nm.

RESUMEN.

Al incidir la luz en los tejidos, se observan efectos similares a los que se tienen en un medio turbio. De tal forma que los mismos efectos ópticos como dispersión, transmisión y reflexión son semejantes.

La interacción de la radiación electromagnética en los tejidos, en particular la luz láser, se absorbe en forma selectiva por cada tipo de tejido. Como si se tratara de filtros pasa banda de los que se utilizan en diseños electrónicos. Una vez que la radiación incide en un tejido, se presentan dos efectos ópticos de gran importancia: la dispersión y la absorción. Al despreciar los efectos de dispersión, se puede hacer una aproximación para calcular la máxima distancia alcanzada al incidir la luz en una capa de tejido, por medio de la ley de Beer-Lambert. Mientras que, la reflexión de la luz al incidir en una superficie, se puede determinar por la ley de reflexión de Fresnel.

La propagación de la luz en un medio cualquiera, depende del albedo, la trayectoria óptica y la función de fase.

Al tratarse de un medio no isotrópico, se toma en cuenta el ángulo de incidencia de la luz. La función coseno del ángulo promedio g , que es una medida de que tanta luz es dispersada hacia delante. Estos valores pueden estar en el intervalo de -1 a 1 .

Al aplicar radiación láser, además de los efectos que son totalmente ópticos, se tienen otros que dependen de las propiedades del material y de la dosis de radiación aplicada, tales como efectos fotoquímicos, electromecánicos y de ablación, entre muchos otros cambios que pueden ser observados.

Tiina Karu y Kendric dan una explicación a nivel celular y molecular, de la interacción de la luz visible e infrarroja respectivamente.

Se dio una breve introducción a los laseres, así como una tabla de los más comerciales.

Una terapia láser es una alternativa en el tratamiento de la consolidación de fracturas óseas.

En el siguiente capítulo se presenta la metodología para hacer este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

1. R. Graff, A. C. M. Dassel, M. H. Koelink, F. F. M. De Mul, J. G., Aarmoudse, W. G. Zijlstra, Optical properties of human dermis *in vitro* and *in vivo*, Applied Optics, 1993, Vo 32, No 4,
2. Farrar SK, Roberts, C. Johnston WM, Weber PA, Optical properties of human trabecular meshwork in the visible and near-infrared region, Lasers Surg. Med, 1999, 25(4), 348-62
3. Chan, Eric K Sorg Brian S, Protsenko, Dmitry, O'Neil m Michael P, Motamedi, Massoud, Welch Ashley J, SPIE, 1997, Vo 2979, 314-324.
4. R. L., Longini, R. Zdrojkowski, A note on the theory of backscattering of light by living tissue, IEEE transactions on Biomedical Engineering, Vo BME-15, No 1, Enero 1968, 4-10
5. Parrish John A., Deutsh, Laser Photomedicine, IEEE-JQE, Vo QE-20, No 12, Diciembre, 1984, 1388
6. H. Friedmann, R. Lubart, Towards an explanation of visible and infrared laser induced stimulation and damage of cell cultures, Resumen de artículo aceptado para su publicación 19 de diciembre de 1992, Laser Therapy
7. Scout Alan Pral., Light transport in tissue, Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias, 1988, Universidad de Austin Texas
8. M. J. C. Van Gemert, Steven L. Jaques, H. J. C. M. Sterenborg, W. M. Star, Skin optics, IEEE-Transactions on Biomedical Engineering, Vo 36, No 12, Diciembre de 1989, 1146-1154
9. R. Cubeddu, M. Musolino, A. Pifferi, P. Taroni, G. Valentini, Time_resolved reflectance: A sistematic study for applications to optical characterization of tissues, I.E.E.E-JQE, Vo 30, No 10, Octubre de
10. Wai Fung Cheong, Scott A Prahl, Ashley J. Welch, A review of the optical properties of biological tissues, IEEE-JQE, diciembre 1990, 2167.
11. S. Wan, R. Rox Anderson, John A. Parrish, Analytical modeling for the optical properties of the skin with *in vitro* and *in vivo* applications, Photochemistry and Photobiology, Vo 34, 494
12. Brian C. Wilson, Steven L. Jaques, Optical reflectance and transmittance of tissue: Principles and applications, IEEE-JQE, 1990, Vo 26, No 12, 2186- 2199
13. Frank, Biophysical fundamentalsfor laser applications in medicine, Lasers in gynecology, 1992, 349-360
14. Chen-Lun Tsai, yi Fong Yang, Chi-Chiang Han, Jui-Hsiang Hsieh, Ming Chang, Measurement and simulation of light distribution in biological tissues, Applied Optics, Vo 40, No 31, Noviembre2001, 5770-5777
15. Francis W. Sears, Mark W. Zemansky, Física general, Aguilar, 1974, 762
16. Laufer J., Simpson CR, Kohl M, Cope M., Effect of temperature on the optical properties of ex-vivo human dermis, Phys. Med. Biol, 1998, 43, 2479- 2489
17. Nonlinear optical behavior
18. of ocular tissue during laser irradiation, Applied Optics, diciembre 1995, Vo 34, No 34, 7979-7985
19. Belkin M, Schwartz, New biological phenomena associated with laser radiation,

- Health Phys. 1989 May;56(5):687-90.
20. Franklin W. Dabby, Un Chulpaek, High intensity laser induced vaporization and explosion of solid material, IEEE Journal of Quantum Electronics, 1972, Vo QE 8, No 2, 106-119
 21. M. Frenz, Ch. Michler, V. Romano, M. Forrer, O. M. Muller, H.P. Weber, Effect of mechanical tissue properties on thermal damage in skin after ir-laser ablation, Applied Physics, 1991, 251-258
 22. Lomelí Mejía Pedro A., Lecona Butrón Hugo, Montiel Hernández Ana Maria, Rosillo Ruiz Angel, García López Eduardo S, Reducción del tiempo de cicatrización por medio del láser de He:Ne: Modelo experimental en conejos, revista de la Sociedad Mexicana de Ortopedia y Traumatología , Septiembre- octubre 1999, 13(5), 455-458
 23. Lowe AS, Walker MD, O'Byrne M., Baxter GD, Hirst DG, Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation impaired, wound healing model in murine skin. Lasers Surg Med, 1998, 23(5), 291-8
 24. Pastore D., Greco M. Passarella S., Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase, Int J. Radiant Biol, 2000, 76(69), 863-70
 25. Karu T. I, Photobiology of low power therapy, Harwood Academic Publishers, 1992, 131
 26. Laufer J., Simpson CR., Kohl M, Cope M., Effect of temperature on the optical properties of ex-vivo human dermis, Phys. Med. Biol, 1998, 43, 2479- 2489
 27. Karu T. I, Photobiological fundamentals of low power laser therapy, IEEE Journal of Quantum Electronics, Vo QE 23, No10, Octubre 1987, 1703-1717
 28. H. Friedmann , R. Lubart, Towards an explanation of visible and infrared laser induced stimulation and damage of cell cultures, Resumen de artículo aceptado para su publicación, 19 de diciembre de 1992, Laser Therapy
 29. Yu A. Vladimirov, A.N. Osipov, G.I. Klevanov, Biochemistry (Moscow), Vo 69, No 1, 2004, 81-90
 30. Coherent E. E., Lasers, Limusa 1986, 11
 31. Sholkin K. I., Física del micro mundo, Mir Moscú, 1971, 179-184
 32. Joseph T. Verdeyen, Laser Electronics, Prentice Hall, 1981, 153

CAPÍTULO 4



METODOLOGÍA

Se expone en este capítulo la metodología para llevar a cabo la investigación. Se presentan con detalle los aspectos teóricos y se plantea la forma en la que se llevarán a cabo las pruebas experimentales.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

Este capítulo describe la metodología utilizada para el desarrollo del presente trabajo, se hace énfasis en puntos clave de la investigación tales como: el peso, sexo y número de animales. También se especifica la longitud de onda y la dosis considerada más adecuada para la estimulación con láser.

4.1 Determinación del número mínimo de animales que han de emplearse y selección de las ratas Wistar.

El número de animales se definió de la siguiente relación: [1]

$$N = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

Donde:

N = tamaño de la muestra.

σ = valor estimado de la desviación estándar.

Δ = mínima diferencia entre las medidas que deseamos detectar.

Z_{α} , Z_{β} = constantes que dependen que el contraste estadístico sea a una ó dos colas. Se obtienen de una tabla de percentiles de la distribución normal estándar. Así se tiene que:

$$Z_{\alpha} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 1.28$$

Para hacer este cálculo se hicieron las siguientes suposiciones:

El tiempo de consolidación se reduce aproximadamente entre un 20 y un 30 % con respecto a un grupo control, así pues se elige a $\Delta = 22$ % [2, 3]

La desviación estándar σ se propone como 0.3. Se espera que la máxima diferencia entre los avances en el grupo control y el experimental no rebasen el 30 %.

De lo anterior se tiene que N es aproximadamente igual a 20 ratas, para cada estudio. Se tomaran en cuenta dos grupos, el control y el experimental. El número total de estudios es cuatro, por lo que se espera trabajar con una población total de 160 ratas.

4.1.1 Selección de las ratas Wistar.

Para la selección de los animales que más convenían, en este estudio experimental, se llevó a acabo una búsqueda bibliográfica, además de tomar en cuenta la experiencia del jefe del Servicio

de Cirugía Experimental, del Centro Nacional de Rehabilitación.

Las razones por las cuales se decidió por ratas Wistar, macho, en el rango de 350 a 400 g son las siguientes:

- De la búsqueda bibliográfica [4, 5, 6, 7] se sabe que ratas en el peso de 300 a 400 g, se consideran adultas jóvenes. De esta forma no se toman en cuenta efectos hormonales y relacionados con el desgaste orgánico [envejecimiento].
 - Debido a sus dimensiones se pueden alojar en el bioterio.
 - El costo de su alimentación por día, con respecto a otros animales de experimentación (perros, gatos, conejos) es bajo.
 - Son animales de bajo costo

4.2 Determinación de la longitud de onda, dosis y tiempo de aplicación del láser.

4.2.1 Determinación de la longitud de onda.

El primer paso en esta etapa experimental es determinar cual es el intervalo de longitudes de onda,

donde se tiene el menor coeficiente de absorción μ_a [8, 9] en piel de rata Wistar, ya que la máxima trayectoria (la máxima profundidad que puede alcanzar el haz láser en el tejido) que puede alcanzar la luz es inversamente proporcional a este coeficiente. Para este propósito se hicieron estudios foto acústicos, y se sabe a partir de ello que la longitud de onda puede ser la que corresponde a 830 nm. Esta luz puede ser obtenida por un diodo láser de arsenuro de galio aluminio.

4.2.2 Determinación de la dosis.

Para determinar la dosis se tomó en cuenta la revisión bibliográfica y la ley de Arndt-Schultz [10] que establece que es posible obtener una estimulación a nivel celular, siempre y cuando los niveles de energía sean bajos, pero si son altos se puede inhibir el proceso fotodinámico. Esto es debido a que las células necesitan un tiempo mínimo de relajación, para mantener un equilibrio termodinámico.

De la literatura solamente se obtienen intervalos de confianza para la aplicación del láser, pero las dosis correctas se obtienen a partir de ensayos piloto, ya que de un individuo a otro la respuesta puede ser diferente, debido a muchas variables, por ejemplo, densidad de los tejidos, contenido de agua y aún el color de la piel pueden intervenir. Para esta investigación se propone una dosis de 5 J/cm², como lo sugiere Baxter [11].

4.2.3 Determinación del tiempo de aplicación.

Es necesario recordar que la potencia P de un emisor de energía luminosa cualquiera, esta determinada como:

$$P = \frac{E}{t}$$

Donde:

E_l = Energía proporcionada por el láser [Joules] ó [J]
 t = Tiempo durante el cual se proporciona la energía.

E_l se puede expresar como: $E_l = P \cdot t$

La energía proporcionada por el diodo láser es una constante. Al tomar en cuenta la distribución de energía en una determinada área de aplicación, se tiene:

$$D_E = \frac{E_l}{A}$$

Donde:

A = Ventana efectiva. (Sección transversal donde sale el haz, del diodo láser)
 I = Intensidad efectiva.

Para el caso del láser seleccionado se tiene que su ventana efectiva es de 2 mm de diámetro, lo cual indica que el haz láser tiene esta dimensión. Por lo tanto D_{El} es: 3.1 J/seg

Por conservación de la energía se tiene que:

$$\text{DENSIDAD DE ENERGÍA ENTREGADA POR EL LÁSER} = \text{DENSIDAD DE ENERGÍA RECIBIDA POR EL TEJIDO}$$

$$D_{El} = D_R$$

Donde:

D_{El} = Densidad de energía proporcionada por el láser.
 D_R = Densidad de energía aceptada para lograr la foto estimulación.

D_R se puede expresar como:

$$D_R = E_R \cdot \frac{t}{A}$$

De lo anterior se tiene que:

$$t = \frac{D_{El} \cdot A}{E_R}$$

Al sustituir el valor de D_{EI} , del área de aplicación, que en este caso es aproximadamente de se tiene que el tiempo necesario para dar una dosis de 5 J es: 0.019 s

4.3 Desarrollo experimental

Se toman como base experimental de esta investigación, para el tratamiento de fracturas con láser los resultados obtenidos por otros investigadores [12, 13, 14].

4.3.1 Preparación de la muestra.

El cuidado, alimentación y uso de los animales, se llevará a cabo de acuerdo a la norma oficial NOM Z0066_98 (que habla del uso, manejo y cuidado de los animales de laboratorio)

Para este trabajo se dispondrá de 160 ratas macho, cepa Wistar, adultas, con peso en el rango de 350 a 400 g y se organizarán en 2 grupos, de 80 ratas cada uno, como se indica enseguida:

A, B

Donde:

A = grupo experimental.

B = grupo control.

Todos los animales se alojarán en cajas de policarbonato transparente, tamaño jumbo con capacidad para seis ratas. Cada caja tiene tapa de acero inoxidable, comedero incluido, bebedero de cristal, paredes lisas, tapón de hule y pipeta de acero inoxidable. Se colocarán en anaqueles de acero inoxidable, en una habitación, con temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad controlados (12 x 12 hr). Se alimentarán con pelets balanceados, propios para esta especie y agua a libre demanda.

A cada jaula se le colocará una etiqueta de registro, indicando el número de animales en cada caja, número de caja, el grupo al que pertenece, fechas de Cirugía (Qx) y de sacrificio. Así como los nombres, tanto del investigador responsable como del protocolo. Las ratas de ambos grupos se trasladarán al quirófano de cirugía experimental, desde el bioterio y el proceso quirúrgico se detalla a continuación:

4.3.1.1 Procedimiento: [15]

- Pesar las ratas de todos los grupos.
- A todas las ratas se les aplicará una dosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg/P intraperitoneal, 5mm por debajo de la apófisis xifoide (Donde P es el peso del animal), con una jeringa para insulina.
- Rasurar la pata derecha desde la articulación tibio-tarsal hasta la cadera. Los detalles de donde se anestesia, así como la forma en que se rasuran las ratas se muestran en la figura 5.1.



(a)



(b)

Figura 4.1 (a) Forma de anestesiar las ratas. (b) Detalles de cómo se rasuran las ratas.

- Limpiar con yodo espuma.
- Hacer una incisión longitudinal, en la piel de 3 a 5 mm en la parte medial, cráneo distal de los cóndilos, de la tibia y extender a la parte distal de la diáfisis.

Enseguida la fascia del músculo tibial craneal y el flexor digital medial se inciden. La incisión se debe continuar hasta incidir en la fascia del músculo tibial craneal y flexor digital medial.

- Se limpiara con gasa, para retirar el exceso de sangre, y de esta forma permitir la observación del procedimiento quirúrgico.
- Se colocan separadores, de tal forma que sea posible apreciar la tibia.

En la figura 4.2 se muestran detalles de la cirugía, para fracturar la tibia, de cada rata.

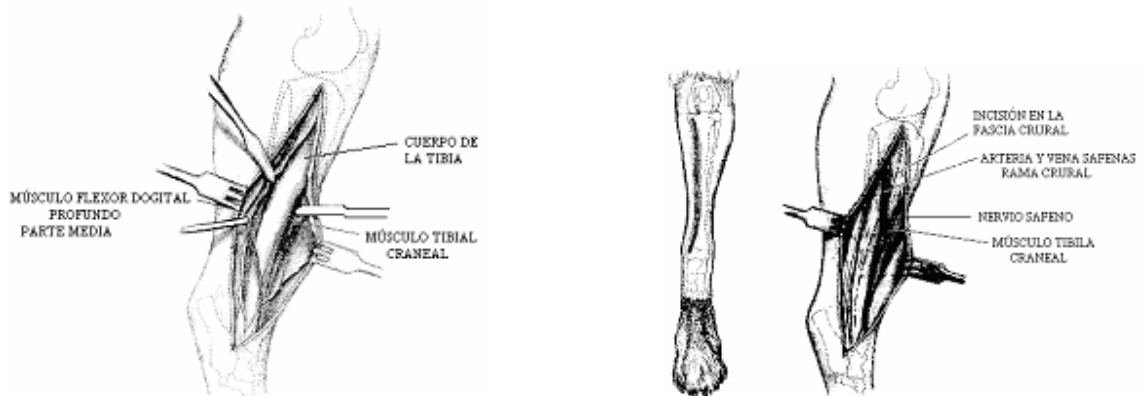


Figura 4.2 Detalles de la incisión en la tibia, para observar el hueso, y posteriormente hacer la fractura.

4.3.1.2 Realización de la fractura

- El trazo de la fractura se realiza a cielo abierto, en la parte central de la diáfisis tibial, con una segueta de joyero, procurando no lesionar los tejidos blandos. En la figura 5.3 se muestran detalles del corte.
- Se introducirá un alambre Kirschner de 0.35 mm de diámetro, de forma retrógrada siguiendo el canal medular del fragmento proximal de la tibia hasta salir por la tuberosidad tibial anterior, todo asistido por un taladro automático. Se reduce la fractura y se introduce el alambre ahora de forma anterógrada hasta fijar ambos extremos.
- Se limpiará con gasa para retirar el exceso de sangre y de esta forma permitir la observación del procedimiento quirúrgico.



Figura 4.3 Detalle de la forma en que se efectúa la fractura en la tibia. Se muestran los separadores (a) y la segueta (b)



Figura 4.4 Sutura por planos después de colocar el clavo Kirschner.

- Por último, limpiar con solución salina.
- Se coloca la rata en su jaula.
- Grupo A, se irradiará con diodo láser (AsGaAl, 830 nm, potencia de 30 mWatts y a una emisión continua), 1 minuto, en toda la zona del trazo de la fractura, desde que sucede el traumatismo y hasta los siguientes 15 días.
- Grupo B, se tratará en forma conservadora. Solo se observará que estén bien alineados los fragmentos de hueso y se le brindarán los cuidados necesarios para evitar alguna infección.

Los sacrificios y análisis, se llevarán a cabo al día 7, 14, 21 y 28 después de la fractura, para ambos grupos.

- Se sacrificarán al colocarlas en una caja de acrílico y posteriormente saturar la atmósfera con bióxido de carbono (CO₂) por un tiempo aproximado de 2 a 7 minutos.
- Se desarticularán ambas tibias y limpiarán dejando sólo el hueso libre de todo tejido blando con una hoja de bisturí del # 20 y mango del # 4.

Todo el proceso quirúrgico se registrará por medio de cámaras de video y de fotografía.

4.3.2 Estudios para la evaluación del avance de la fractura.

A todos los grupos se les harán los estudios, que se indican a continuación:

Al grupo de animales que se sacrifique, de acuerdo al calendario de sacrificios y análisis, se les practicarán los siguientes estudios

Microscopia electrónica de barrido ambiental (SEM)

Biomecánico

Histológico

Fotoacústico

4.3.2.1 Estudios de microscopia electrónica de barrido ambiental.

Objetivos:

Conocer los porcentajes de:

- Calcio
- Cloro
- Fierro
- Fósforo
- Magnesio

- Potasio
- Silicio
- Sodio

Obtener microfotografías que permitan conocer el avance de la formación del callo, así como sus dimensiones, en diferentes etapas.

Principal equipo de este estudio:

Microscopio: marca Phillips

Modelo: XL-30-ESEM

Procedimiento para el estudio de microscopía electrónica de barrido ambiental.

- Fijar las tibias en glutaraldeído al 2.5 % durante una hora.
- Lavar cada muestra 4 veces durante 5 minutos con amortiguador de fosfatos (0.1, pH = 7.4).
- Posteriormente, lavar con agua desionizada, para eliminar residuos del fijador.
- Retirar todo el tejido blando de la tibia.
- Hacer cortes longitudinales de la zona de la fractura. Las dimensiones son aproximadamente de 5 x 5 cm
- El fragmento se coloca en un porta muestras circular de acero inoxidable y se fija con plastilina conductiva, de alto contenido de carbono (marca NEUBAUER CHEMIKALIEN)
- Colocación del porta muestras en la cámara del ESEM-EDX, en condiciones de vacío (0.9 Torr)
- Observar directamente al microscopio.

Número total de ratas disponible para este estudio: 5 por cada grupo de estudio

4.3.2.2 Estudios biomecánicos.

Objetivo:

Hacer un estudio comparativo a flexión en tres puntos, de las tibias del grupo control con respecto a las del grupo experimental, como se muestra en la figura 5.5, para determinar:

- energía de deformación
- resistencia a la cedencia
- rigidez

De esta forma se espera determinar desde un punto de vista totalmente mecánico, cual es el avance del proceso de la consolidación, en función del tiempo.

Número total de ratas disponible para este estudio: 5 por cada grupo de estudio.

Principal equipo de este estudio:

Máquina universal Instron.

Modelo: 4502

Procedimiento:

- Desarticular ambas tibias, de una rata, de cada grupo y limpiarlas quitando todo tejido blando.
- Identificar si son izquierdas ó derechas y al grupo que pertenecen.
- Programar la máquina universal Instron para hacer ensayos a flexión

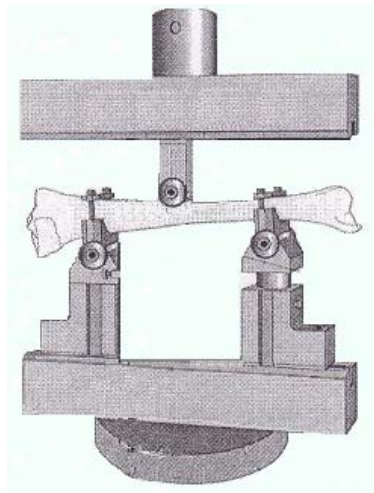


Figura 4.5 Forma de hacer los estudios biomecánicos en las tibias fracturadas.

4.3.2.3 Estudio histológico.

Objetivos:

Analizar y cuantificar:

- el grosor del callo óseo
- la formación de vasos sanguíneos
- la formación osteoide
- la restauración ósea completa
- presencia de tejido conectivo, que puede ser:
 - laxo ó denso
- presencia de osteoblastos
- tejido de granulación

Procedimiento:

- limpiar las tibias, dejándolas sin tejido blando.
- colocar, en frascos con formol, con una etiqueta indicando claramente el grupo al que pertenecen, así como la extremidad si es izquierda o derecha. Fecha de colocación del alambre Kirschner y de sacrificio. También el nombre del investigador responsable.

Las muestras de tejido óseo se preparan según los siguientes pasos:

- Fijar el tejido en formol al 10 %
- Deshidratar
- Colocar en baños de parafina
- Hacer inclusión de parafina del tejido
- Hacer cortes a 5 μm
- Teñir con hematoxilina-eosina
- Hacer el montaje del tejido en cubreobjetos
- Observar al microscopio

Temperaturas, y tiempos de exposición, son definidos, según el tamaño, y tipo de tejido a tratar, así como la densidad de la tinción a usar.

Número total de ratas disponible para este estudio: 5 por cada grupo de estudio.

4.3.2.4 Estudio fotoacústico.

Objetivos:

Determinar el espectro de absorción óptica, en los distintos estadios de la consolidación ósea de tibias fracturadas de ratas.

Número total de ratas disponible para este estudio: 5 por cada grupo de estudio.

Procedimiento:

- Retirar completamente todos los tejidos blandos.
 - Lavar con agua.
- Envolverlas en papel, y dejarlas secar en forma natural, al menos un par de horas.

Observar la zona donde se localiza el trazo de fractura. Si es muy pequeño raspar el callo formado y depositarlo en una bolsita de celofán o plástico (dimensiones de 10 x 6cm). En caso contrario, cortar un fragmento aproximado de 5x 4 mm y depositarlo en la bolsita.

- Colocar etiquetas de identificación.

Llevar las muestras al laboratorio de Foto acústica del departamento de Física del CINVESTAV.

En el laboratorio de Foto acústica el procedimiento es el siguiente:

- Encender los siguientes equipos en el orden siguiente:
 - ventilador de la lámpara del monocromador ORIEL
 - control del monocromador.
 - computadora personal.
 - chopper (SR-540 STANFORFD RESEARCH SYSTEMS)
 - amplificador lockin. SR-850 (STANFORFD RESEARCH SYSTEMS)

Lámpara de xenón a través de un pulsado.

- Colocar la muestra en la celda óptica.
- Se corre el programa de adquisición de datos (Bismex). Al establecerse este programa se indican los siguientes parámetros:
- longitud de onda inicial.
- 400 nm (que es el pico de emisión de la lámpara de xenón). Esto determina la señal máxima.
- Se selecciona la escala del amplificador lockin, de tal forma que la señal del micrófono pueda ser modulada y amplificada. Se determina la más cercana al valor indicado, por la medición anterior, pero sin llegar a los extremos de la escala.
- Una vez ajustada la escala, a través del programa se indican los siguientes parámetros:
 - nombre del archivo.
 - nombre del operador
- Intervalo de longitudes de onda que ha de proporcionar el monocromador.
 - Si el espectro que se desea obtener se quiere normalizado, con respecto al de la lámpara xenón, o no.
- Se da inicio para ejecutar el programa y todos los eventos relacionados al mismo.
- Se captura la información para su análisis al final del estudio.

El análisis estadístico de todos los estudios se llevara a cabo con el programa SPSS.

4.4 Justificación de la elección del láser

Para decidir cual es la longitud de onda, de la luz, que mayor penetración puede tener al aplicarse directamente en la piel y en consecuencia, el láser que se ha de usar, se dieron los siguientes pasos:

- Búsqueda bibliográfica
- Análisis foto acústico de piel de rata
- Consulta con investigadores que hacen aplicaciones del láser, en el Departamento de Física de CINVESTAV

En seguida se presenta el espectro de absorción óptico de la piel de rata adulta, de la cepa Wistar. Este espectro se obtuvo de un estudio foto acústico en el Laboratorio de Foto Acústica del Departamento de Física del CINVESTAV.

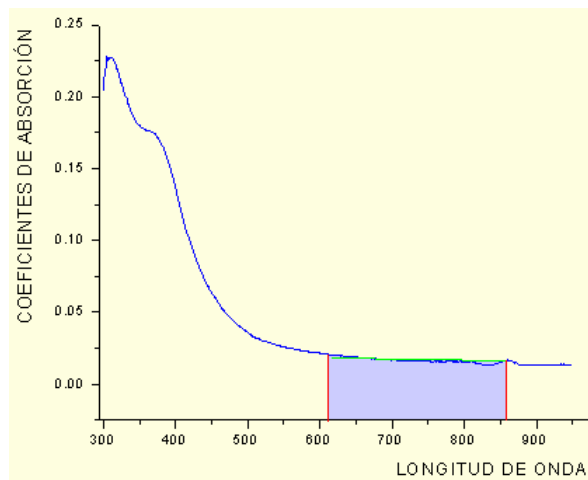


Figura 4.6 Espectro de absorción de la piel de rata adulta de la cepa Wistar.

Como puede observarse se ha hecho un barrido espectral desde la región ultra violeta hasta el infrarrojo cercano

Es claro que las longitudes de onda que corresponden a los menores coeficientes de onda están en el intervalo comprendido de 630 a 850 nm aproximadamente. Ahora bien, puesto que los coeficientes de absorción son inversamente proporcionales a la máxima distancia alcanzada en un tejido al incidir el láser, se decidió conseguir un diodo láser de 830 nm, por ser comercial, además de estar en el rango espectral que corresponde a una mínima absorción en la piel de la rata. .

REFERENCIAS

1. Jesús M. Zúñiga, Joseph A. Tur Mari, Silvana N. Milocco, Ramón Piñeiro, Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal, Mc Graw Hill Interamericana, 1995, 612
2. M. A. Trelles, E. Mayayo, Bone fracture consolidates faster with low-power laser, *Lasers in Surgery and Medicine*, 1987, 36-45
3. I. G. F. Freitas, V. Baranauskas, Cruz-Hofling, Laser effects on osteogenesis, *Applied Surface Science*, 2000, 154-155, 548-554
4. Elchanan J. Luger, Semion Rochkind, Yoram Wollman, Galina Kogan, Shmuel Dekel, Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats, *Lasers in Surgery and Medicine*, 1998, 22; 97-102
5. O. Barushka, T. Yaakobi, U. Oron, Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia, *Bone*, 1995, Vo 6, No 1, 47-55
6. I.G.F., Freitas, V. Baranauskas, M.A. Cruz-Höfling, Laser effects on osteogenesis, *Applied Surface Science*, 2000, 548-554
7. Rami David, Moshe Nissan, Izhak Chen, Michael Soudry, *Lasers in Surgery and Medicine*, 1996, 19, 458-464
8. Scott Alan Prahl, Light transport in tissue, Tesis doctoral, Universidad Austin Texas, 1988, 81

9. R. Graff, A. C. M. Dassel, M. H. koelink, F. F. M. de Mul, J. G. Aarnoudse, Optical properties of human dermis in vitro, *Applied Optics*, Vo 32, No 4, 435-447
10. Endre Mester, Andrew F. Mester, Adam Mester, The biomedical effects of laser application, *Lasers in Surgery and Medicine*, 1985, 31- 39
- 11.
12. Y. Ozawa, N. Shimizu, g. Kariya , Y. Abiko, Low energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarian cells, *Bone*, 1998, 22, 4, 347-354
13. Robert B. Mc Comb, George N. Bowers, *Alkaline Phosphatase*, Plenum Press, 1979
14. Elchanan J. Luger, Semion Rochkind, Yoram Wollman, Galina Kogan Shmuel Dekel, *Lasers in Surgery and medicine*, 1998, 22, 97-102
15. Piermattei, *Atlas de abordajes quirúrgicos de huesos y articulaciones, en perros y gatos*, Mc Graw Hill Interamericana, 1996, 300-303

CAPÍTULO 5



DISEÑO DE UN ESTIMULADOR LÁSER PARA ACELERAR LA CONSOLIDACIÓN ÓSEA

*Se presenta el diseño de un
estimulador láser para la
consolidación ósea.*

CAPÍTULO 5

DISEÑO DEL ESTIMULADOR LÁSER

5.1 DISEÑO

El diseño de este estimulador láser para la consolidación ósea, se basa en la respuesta biológica de los tejidos orgánicos, de aceptar solamente algunas longitudes de onda del espectro electromagnético y transformar esa energía aceptada, en una serie de eventos, que dan como resultado la estimulación de la osteogénesis.

El primer paso fue hacer una búsqueda bibliográfica, y de mercado para saber si existe algún equipo similar.

Necesidades técnicas de diseño:

- El equipo debe ser capaz de proporcionar las siguientes frecuencias: 12, 60, 120, 180, 240, 300 Hz. Esto es debido a que las células actúan de forma semejante a un diapasón. Así que al someterlas a luz de frecuencias semejantes a la frecuencia cardiaca, se tienen las mejores respuestas. Es esta la razón por la cual los equipos comerciales, tiene disponibles frecuencias con este criterio de diseño.
- Control de tiempos de operación desde 3 hasta 15 min. El tiempo máximo de aplicación de las terapias láser es de 15 minutos, es esta la razón por la que se eligieron estos intervalos de tiempo.
- Selección de una frecuencia cualquiera, la cual pueda ser proporcionada por el equipo durante el tiempo deseado.
- Posibilidad de reprogramarlo a voluntad..
- Detector de la emisión láser emitida.
- Paro de emergencia

El diseño a bloques propuesto del estimulador se presenta en la figura 5.1.

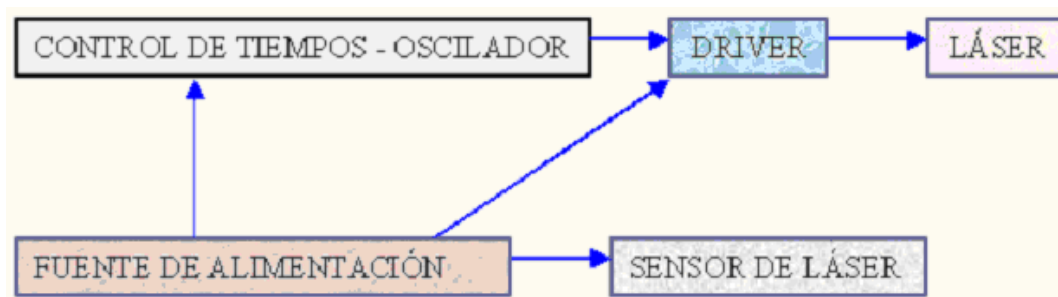


Figura 5.1 Diseño a bloques del estimulador de la consolidación ósea con láser.

Enseguida se analizan y presentan los diagramas correspondientes a cada una de las etapas del diseño.

Fuente de alimentación.

La fuente es de propósito general [1, 2], su diagrama se muestra en la figura 5.2 y sus componentes son las que se indican en la lista siguiente:

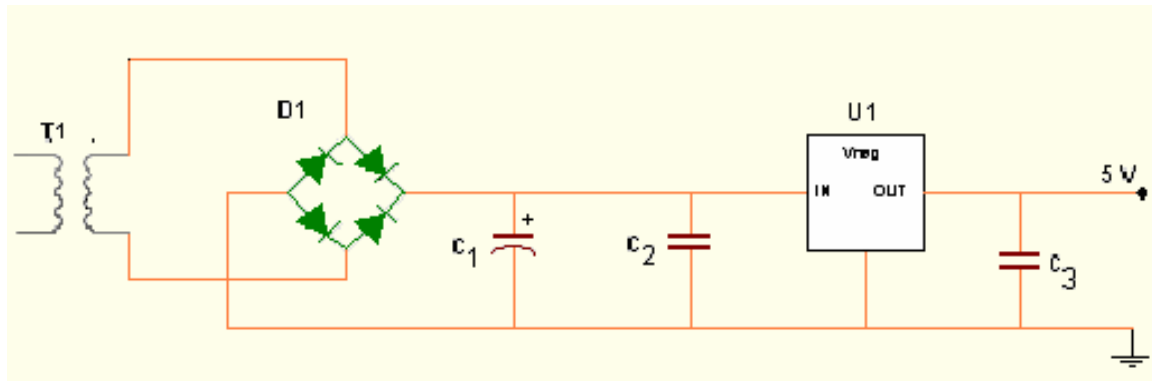


Figura 5.2 Fuente de alimentación del circuito.

COMPONENTE	DESCRIPCIÓN
T ₁	Transformador con núcleo de hierro, laminado. Entrada a 127 V ca y salida a 12 V ca, con una corriente máxima de 1 Ampere.
D ₁	Puente de diodos rectificadores
C ₁	Condensador filtro de entrada de 2000 µfd a 25 V
C _{2,3}	Condensadores filtro de entrada de 0.001 µfd a 250 V

U ₁	Regulador de voltaje 7805
----------------	---------------------------

Circuito driver (Acoplador).

Los circuitos driver para diodos láser pueden ser de dos tipos:

- Control automático de corriente (ACC) y
- Circuitos de control automático de potencia (APC)
- Los circuitos de control automático de corriente, proporcionan una corriente constante. Los ACC se utilizan sólo en diseños muy especializados, tales como circuitos para medir las características de los diodos láser.
- Los circuitos APC proporcionan un mayor control en la potencia de la luz emitida, ya que es posible tener una compensación por variaciones de temperatura.

El circuito APC que se seleccionó es el que sugiere SANYO [2], para el diodo láser que se usará y su diagrama es el que se muestra en la figura 5.3

Cuando el diodo láser emite luz, una corriente I_m es sensada por el fotodiodo P_d y un voltaje $V_1 = I_m(R_3 + R_4)$

Este voltaje es enviado al circuito comparador por medio del seguidor emisor, donde se compara con respecto a un voltaje de referencia. La salida de este comparador se envía a la base del transistor Q1 (2SD1684). De esta forma, al conmutar se mantiene constante la corriente del diodo láser.

5.2 CALIBRACIÓN:

Para que el diodo láser funcione con una corriente constante, es necesario seguir los siguientes pasos de calibración, posteriormente quedara ajustado el circuito para funcionar sin más cuidados.

- 1- Mover el potenciómetro de 50 k Ω a su valor más alto.
- 2- Mover el Potenciómetro de 5 k Ω , de forma tal que V_2 sea 0
- 3- Colocar el diodo láser, mientras la fuente de alimentación este apagada.
- 4- Encender la fuente de alimentación.

- 5- Mover el Potenciómetro de 5 kΩ a su valor medio aproximadamente, mientras se mide la potencia de salida del diodo láser. La potencia que se debe medir es ½ de la potencia indicada.
- 6- Si la diferencia del nivel seleccionado es significativa, entonces es necesario apagar la fuente de alimentación y ajustar el Potenciómetro de 50 kΩ y el valor de R₄

Enseguida se presenta el diagrama del circuito para acoplar el diodo láser al oscilador (Driver).

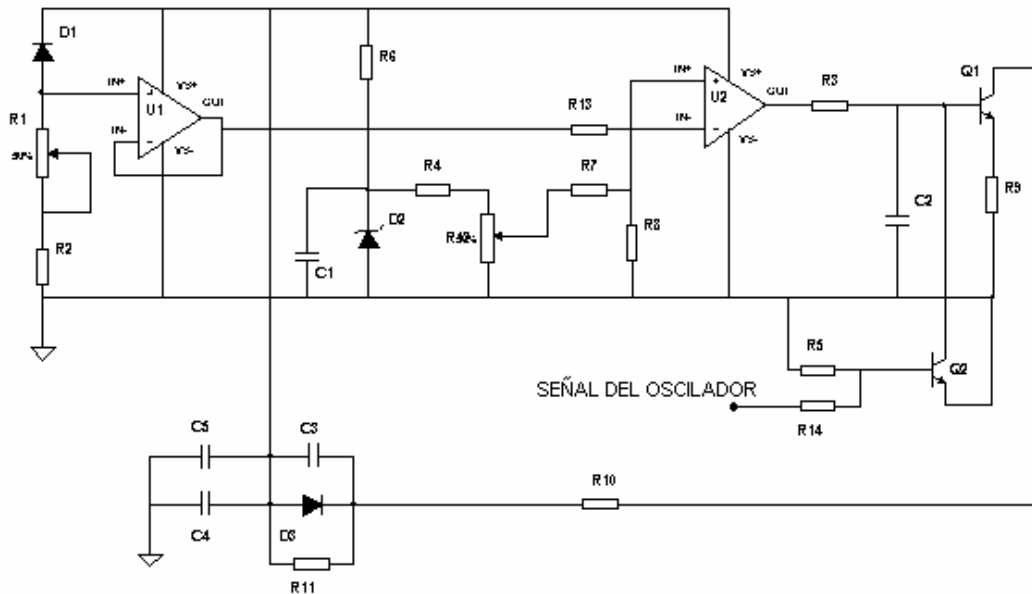


Figura 5.3 Circuito para acoplar el diodo láser al oscilador (Driver).

El diseño de este circuito se basó en SANYO [3] y sus partes principales son las siguientes:

- Un circuito seguidor emisor.
- Un circuito sumador.
- Un circuito acoplador de potencia y de swicheo

Sus componentes son las siguientes:

COMPONENTE	DESCRIPCIÓN	COMPONENTE	CONDENSADOR
	RESISTENCIA [Ω]		[μfd]
R _{2,5}	4.7 k	C ₁	(tantalium o electrolítico) 10
R ₃	470	C ₂	33 (electrolítico)
R _{4,7,13}	2.2 k	C ₃	1
R ₆	1 k	C ₄	47 (electrolítico)
R ₈	47 k	C ₅	0.1
R ₉	10		
R ₁₀	39		
R ₁₁	100 k		
R ₁₄	10k		

POTENCIOMETROS
[k Ω]

R1	50
R12	5

Circuito sensor de la radiación láser.

Para saber cuando el equipo esta emitiendo radiación láser, se diseño un circuito basado en el integrado MC555. También se le conoce como circuito de falta de pulso, debido a que la salida se mantiene en un nivel alto si, el periodo del pulso de entrada es mayor que el correspondiente al de la frecuencia de respuesta.

Cuando incide luz infrarroja en la basa del fototransistor, este se pone en corto y conduce lo que implica que actué como un timer monoestable, con un periodo dado por

$$T= 1.1 R_2.C_1$$

En cambio cuando no hay luz el transistor actúa como un interruptor abierto, y en la pata 2 se tiene un potencial positivo, lo que implica que el MC 555 se mantenga en un nivel alto.

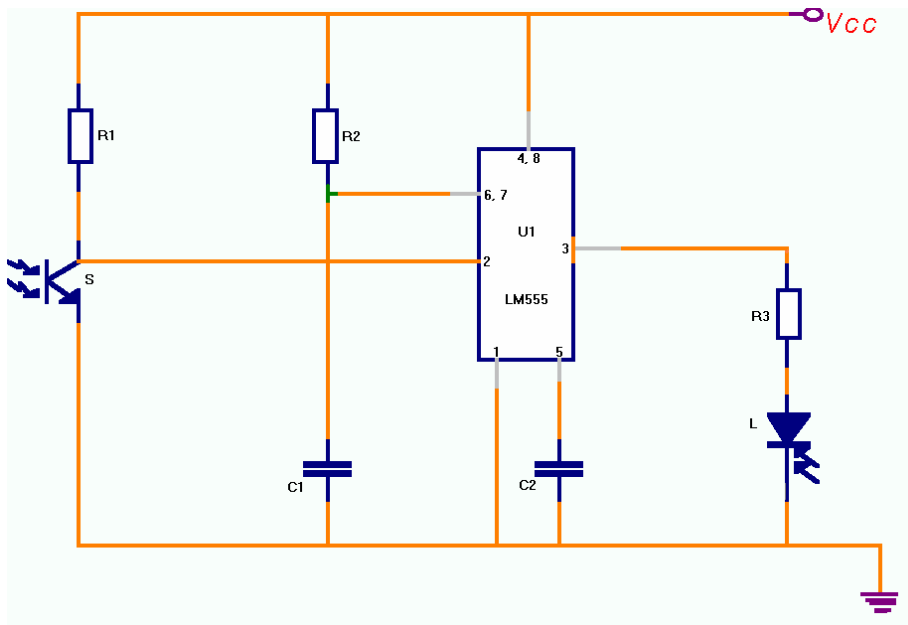


Figura 5.4 Circuito para sensar la radiación láser.

Control de tiempos (oscilador).

Para hacer el control tanto de tiempos como de frecuencias se desarrolló un circuito que fuera simple en su funcionamiento, pero a la vez, que permitiera efectuar las funciones deseadas con absoluta precisión. Antes de obtener este circuito como un prototipo final, ya se había trabajado con un circuito que tenía como base de sus tiempos y frecuencias al 555, pero debido a las constantes tan grandes que se necesitaba emplear, resultó ser inestable. De igual manera se emplearon otros timers y resultados semejantes se obtuvieron, es esta la razón por la que se decidió trabajar con el microcontrolador PIC16F874, para desarrollar esta etapa del equipo. Su diagrama electrónico se muestra en la figura 5.5

El programa de control se presenta en el apéndice de este trabajo.

Longitud de onda entregada	830 nm
Corriente de monitoreo	0.2mA
Divergencia del haz láser	8°

A continuación se presentan los dibujos correspondientes al diseño del circuito impreso de este diseño.

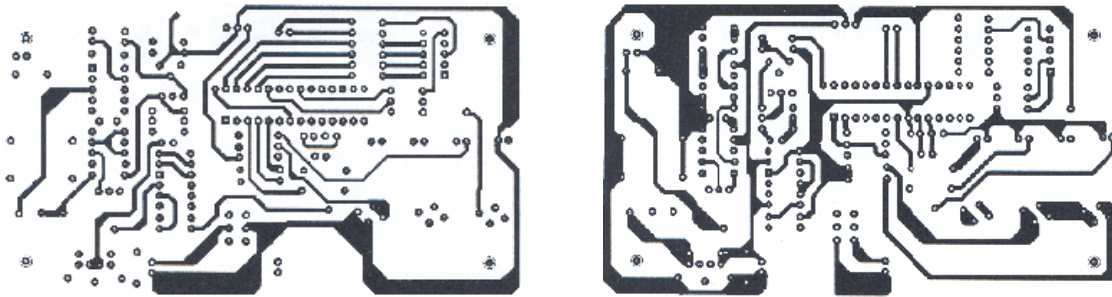


Figura 5.6 Dibujos correspondientes al circuito impreso (a) lado de componentes, (b) lado de soldaduras.

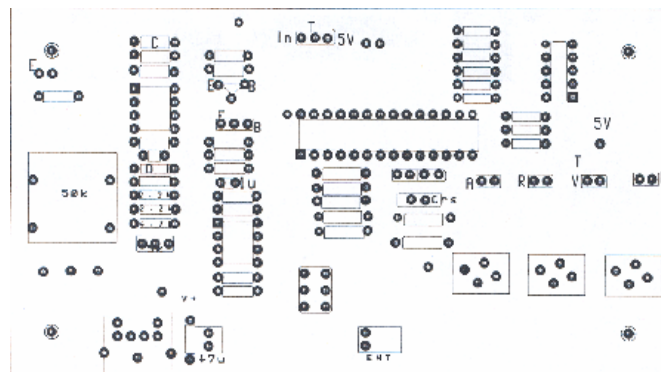


Figura 5.7 Dibujos correspondientes al circuito impreso, respaldo de componentes.

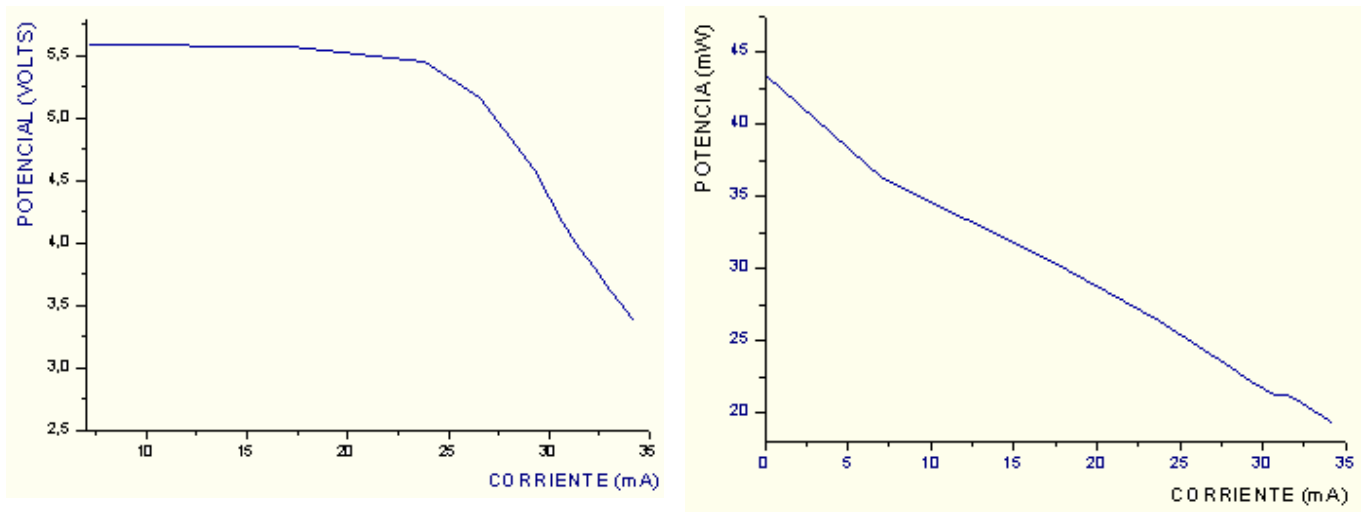


Figura 5.8 Curvas de respuestas del diodo láser.

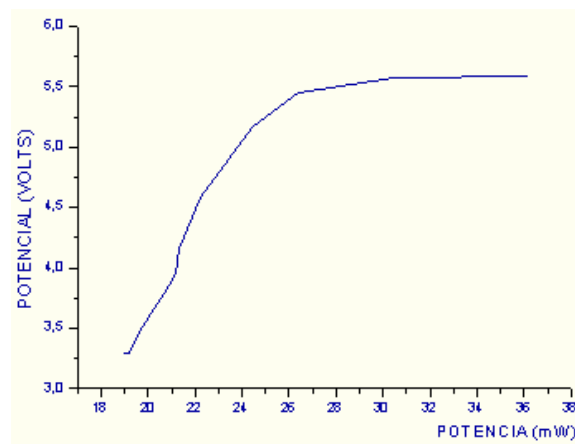


Figura 5.9 Curva de respuesta del diodo láser.

Para llevar a cabo estas gráficas se dispuso de un medidor de potencia láser de la compañía MELLIS GRIOT 13PEM001



Figura 5.10 Tarjeta de control ensamblada. En la parte superior izquierda se observa el soporte del diodo láser.

REFERENCIAS

1. Barry Davis, Understanding D.C. power supplies, Prentice_Hall, Inc, 1983, 85
2. Eugene R. Hnatek, design of solid state power supplies, van Nostrand reinhold Company, 1981, 328,329
3. Laser diodes, Sanyo, 1997, 52,53

CAPÍTULO 6



RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados de los estudios efectuados a los grupos de investigación control y experimental.

Con esta información en el siguiente capítulo se muestra un modelo de la consolidación ósea, en función de variables medidas en este trabajo.

CAPÍTULO 6

ESTUDIOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DEL CALLO ÓSEO.

En este capítulo se presentan los resultados de los estudios que indican como evolucionó el callo óseo al transcurso del tiempo, en el grupo control, posteriormente se presentarán los correspondientes al grupo experimental.

6.1 Estudio biomecánico.

Al llevar a cabo estos estudios se observó, que las tibias fracturadas que corresponden al día 7, del grupo control, no mostraban un callo formado. En algunos casos aún estaban separados los fragmentos óseos.

De la correspondiente investigación para el día 14 se encontró que sólo se ha formado un puente cartilaginoso, pero aún no osificado por lo que al hacer los ensayos mecánicos, su comportamiento fue como si se tratara de material dúctil, como un hule, es decir se deformaban, pero no se rompían. Fue la razón por la cual, estos grupos de estudio no se tomaron en cuenta para presentar sus gráficas.

Los únicos grupos de estudio que se tomaron en cuenta son los del día 21, 28 y 35 después de la fractura.

Para el grupo experimental irradiado con láser, se encontró que el callo óseo se había formado desde el día 7, aunque no estaba osificado todavía. En todas las tibias del grupo experimental se noto una mayor resistencia mecánica.

Es importante señalar que en el grupo control se tiene un considerable retraso en el tiempo de consolidación, que puede ser determinado por dos razones:

- De acuerdo a la teoría de remodelación de Wolf [1], el hueso se remodela en función de los esfuerzos a los que son sometidos. De tal forma que para que consolide y posteriormente se remodele un hueso, es preciso tomar en cuenta los esfuerzos mecánicos aplicados. Sin embargo si existe dolor, es probable que el tiempo de deambulacion se retrase. Tal es el caso de las ratas de este trabajo, a ninguna se les proporciono algún analgésico, posterior a la cirugía. Otra de las razones por las cuales es probable un retraso en la consolidación, es como lo señala el Dr. Joseph Spadaro [2], él menciona que independientemente del estímulo que se aplique en el caso de huesos fracturados, es necesaria la estimulación mecánica, de lo contrario se puede tener o un resultado mínimo o nulo.
- Aún cuando se fijaron los extremos con un alambre de Kirchner, para simular un clavo centromedular, es probable, que existieran micro movimientos en un plano transversal al eje de la tibia. Esto dio como resultado una pseudo artrosis, o consolidación viciosa,

es decir se forma un callo, pero difícilmente se llega a osificar.

En las figuras 6.1 a 6.2 se hace una comparación del comportamiento promedio, tanto de tibias del grupo control como del grupo experimental.

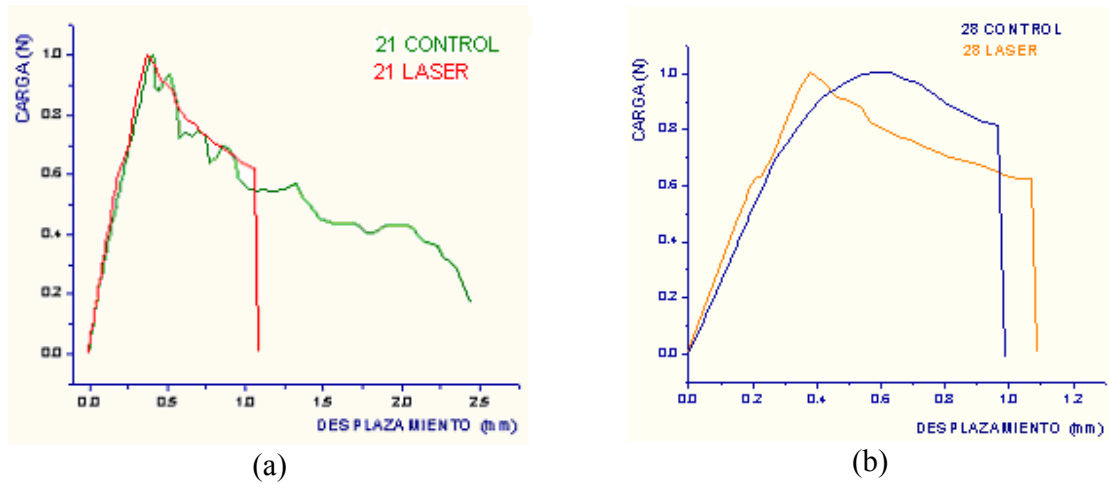


Figura 6.1 Gráfica desplazamiento-carga, para los días 21 y 28 después de la fractura, tanto del grupo control, como experimental.

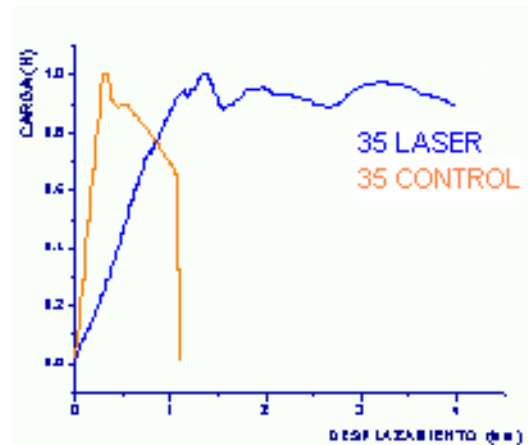


Figura 6.2 Gráfica desplazamiento-carga, para el día 35 después de la fractura, tanto del grupo control, como experimental.

En la gráfica 6.1(a) se observa el comportamiento de las tibias del grupo control y experimental para el día 21 después de la fractura. Esta gráfica se construyó como un promedio del comportamiento de cada grupo de estudio, y están normalizadas. De esta forma

es posible comparar su comportamiento, más que la intensidad de la carga aplicada. Es claro que la energía para deformar los huesos del grupo control es mayor, además de ser más dúctil, que el grupo irradiado con láser.

La gráfica 6.1(b) es similar a la primera. En esta etapa se notaron cambios más significativos:

- En el grupo control se observó un callo duro, pero aún dúctil, en tanto que en el grupo control ya se observa una mayor resistencia al estar el hueso más osificado.

En la gráfica de la figura 6.1(c) se puede apreciar el resultado de aplicar láser, ya que el hueso es más rígido, como consecuencia de una mayor densidad ósea. A partir de este punto es claro que el momento de inercia incrementa en forma considerable puesto que:

$$M = Ir^2$$

Donde:

M = Momento Rotacional

I = Momento Inercial

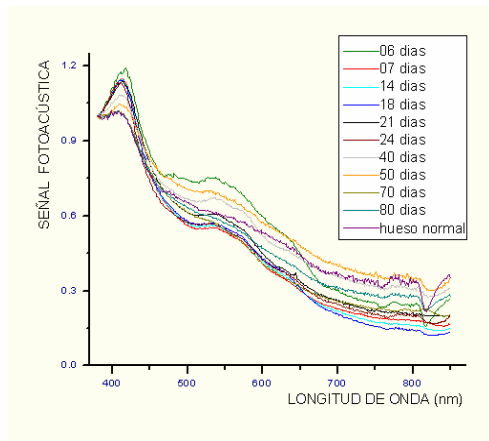
r = Radio del callo que se incrementa, como función del tiempo y de la densidad mineral.

6.2 Estudio foto acústico.

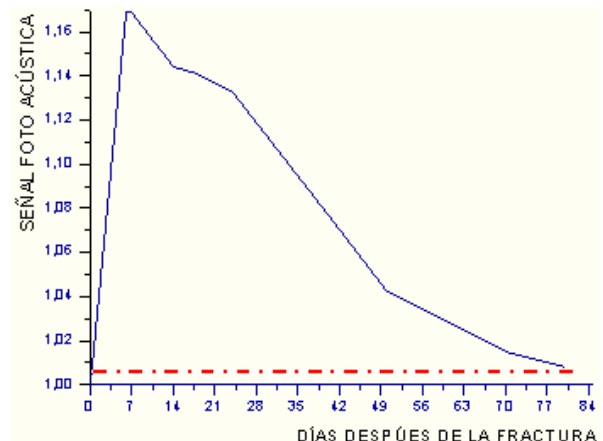
Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Foto acústica, del departamento de Física del CINVESTAV.

En la figura 6.3 (a) se muestra el espectro de absorción óptico, correspondiente a diferentes etapas de la consolidación ósea, para el grupo control. Es importante observar que en la vecindad de 412 nm, se presenta un efecto de picos descendientes. El efecto se debe a que proteínas y enzimas que intervienen en el proceso de la consolidación tienen una respuesta en un rango de absorción muy cercano a esta longitud de onda.

La figura 6.3 (b) se construyó al tomar los valores correspondientes a cada curva en la longitud de 412 nm. De la gráfica se puede observar una distribución de energía, que en las primeras etapas indica un incremento de absorción de luz, en tanto que a medida que transcurre el tiempo la absorción disminuye. Esto es debido a que conforme se hace más sólido el callo óseo menos luz puede atravesar su superficie.



(a)



(b)

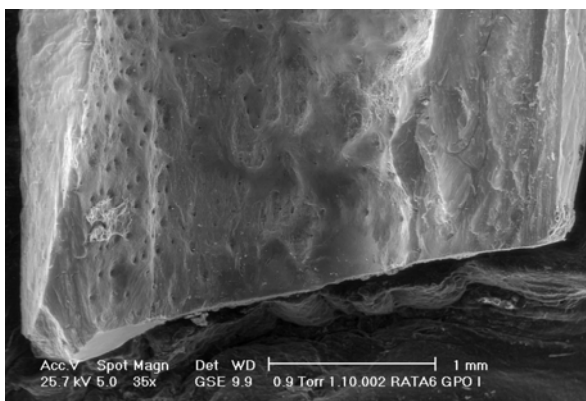
Figura 6.3 Graficas del grupo control: (a) Espectro de absorción óptica de la consolidación ósea, como función del tiempo. (b) Espectro de la contribución de enzimas y proteínas en la formación del callo óseo, como función del tiempo. La línea roja indica el nivel correspondiente a la señal foto acústica, de un hueso no fracturado. La respuesta de un hueso fracturado, sano, en el proceso de remodelación se aproxima asintóticamente a esta línea.

6.1 Estudio histológico.

Se presentaran los resultados correspondientes a este estudio en un artículo, ya que en el CNR, no se tiene el equipo para hacer histomorfometría.

6.2 Estudio de microscopía electrónica.

Por medio de este estudio de microscopia electrónica de barrido ambiental (SEM), fue posible obtener imágenes, tanto del grupo control, como experimental, de esta forma es posible, comparar el nivel de consolidación, a través de microfotografías. También fue posible por medio de difracción de rayos X conocer algunos de los elementos, que contribuyen en la formación del callo óseo, como se explica en el capítulo 2, de este trabajo.



(a)



(b)

Figura 6.4 Microfotografías correspondiente al día 6, del grupo control (a). Y de 7 días del grupo experimental (b). Ambas después de la fractura.

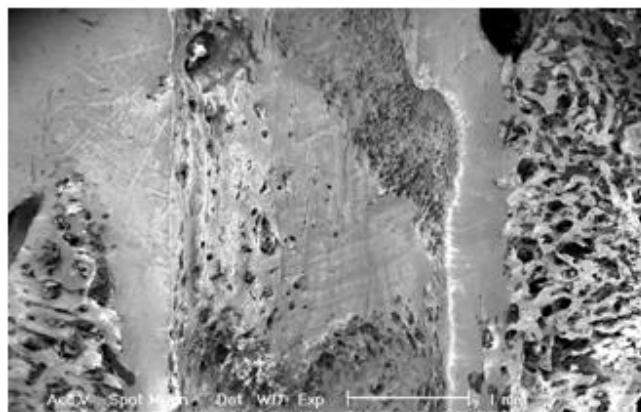


Figura 6.5 Microfotografía correspondiente al día 14 después de la fractura, del grupo experimental.

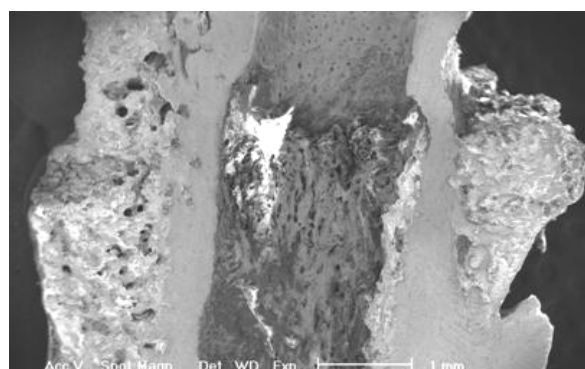
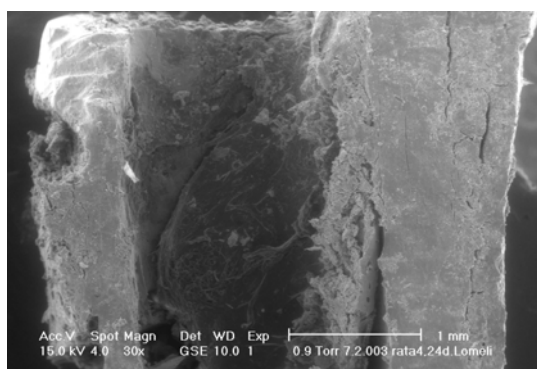
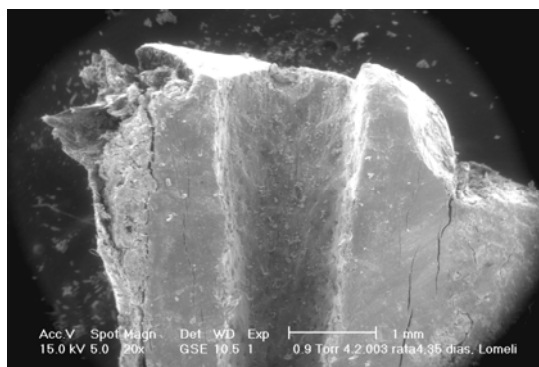
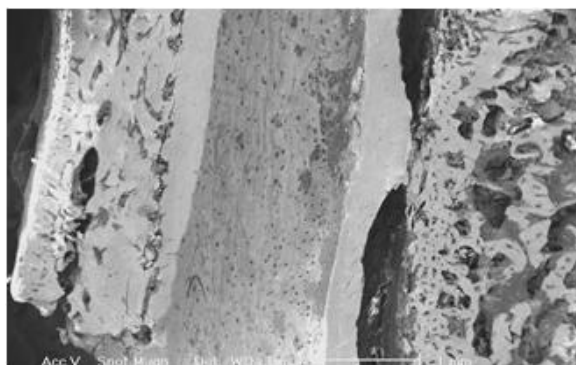


Figura 6.6 Microfotografías correspondientes al día 24, para el grupo control y 21 para el grupo experimental. Ambas después de la fractura.



(a)



(b)

Figura 6.7 Microfotografías correspondiente al día 35 después de la fractura, para el grupo control (a) y de 28 días para el grupo experimental. Ambas después de la fractura.

Es importante observar que en esta última fotografía se presenta un callo más sólido, pero además más reducido, que en las anteriores microfotografías. Esto es debido a que ya es la etapa de remodelación ósea, en la cual se espera tener las dimensiones del hueso como antes del traumatismo. Este proceso puede durar varios meses, dependiendo de la actividad física, el metabolismo, la nutrición y otros parámetros.

Tabla 6.1 Elementos encontrados en el estudio de microscopía electrónica, por difracción de rayos X, para el grupo control.

ELEMENTO	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21	DÍA 28
Ca	34.8605	31.5495	33.60625	33.9743	31.04525
Cl	0.0775	0.0865	0.14027	0.0483	0.76775
Fe	0.291	0.09	0.1305	0.0738	0.0795
K	0.1303	0.2455	0.2605	0.2487	0.2295
Mg	0.297	1.0925	0.92425	0.4031	0.2933
Na	0.23612 5	0.281	0.2915	1.0751	1.354525
P	17.0555	15.2395	16.07525	16.5533	16.06725
S	0.1535	0.4615	0.733925	0.2123	0.22275

Tabla 6.2 Elementos encontrados en el estudio de microscopia electrónica, por difracción de rayos X, para el grupo experimental.

ELEMENTO	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21	DÍA 28
Ca	34.8605	36.7371	34.89321 8	35.08951	32.19425
Cl	0.0775	0.056	0.07075	0.07277	0.671354
Fe	0.291	0.0845	0.077	0.15096	0.090406
K	0.1303	0.2062	0.242018	0.27 712	0.271064
Mg	0.297	0.5348	0.662937	0.55245	0.557218
Na	0.23612 5	0.3619	0.380812	0.30846	0.344104
P	17.0555	17.6134 2	17.31678 1	16.29150	16.10220
S	0.1535	0.15931	0.270406	0.305058	0.36093

A partir de estos datos se obtuvieron las siguientes gráficas que indican la distribución de minerales encontrados durante la formación del callo óseo, como función del tiempo.

La hormona paratiroides que es generada por la glándula tiroides, tiene una influencia significativa en el proceso de la consolidación [3], de tal forma que mantiene el control de fósforo y calcio en intervalos normales, durante toda la vida, mediante una retroalimentación negativa. De esta forma mientras un elemento se mantiene en niveles altos, otro esta bajo, como se muestra en las siguientes figuras.

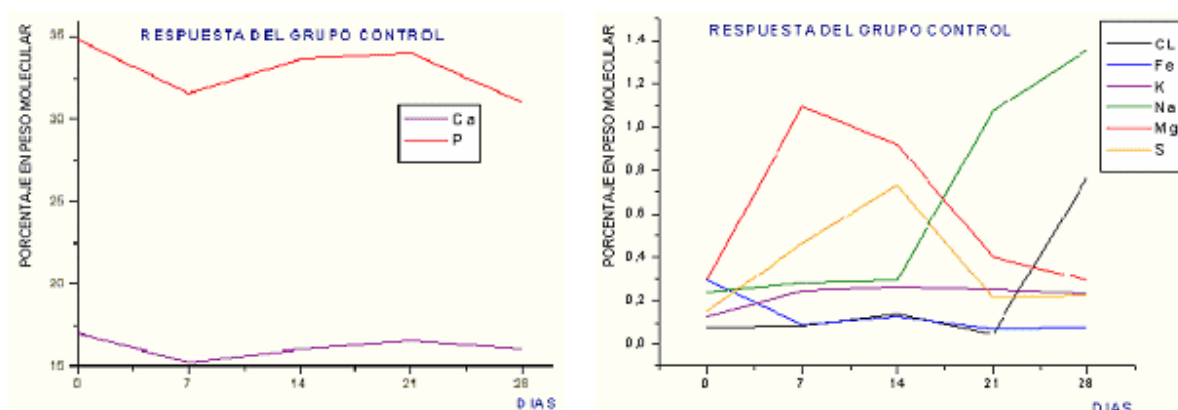


Figura 6.8 Distribución de elementos en el trazo de la fractura, durante la formación del callo óseo, como función del tiempo.

De este estudio se concluye que al día 7 se incrementa en forma moderada P y S. A partir del día 14 se nota un mayor aumento de elementos presentes en la formación del callo óseo. Así tenemos que se incrementa Ca, Na, P y el S. Mayores cambios se obtienen al día 21 ya que se incrementa el Ca, Cl y el Fe, en tanto que se reduce el S y P. El magnesio no cambia en forma significativa. Cambios más considerables se tienen al día 28 ya que se incrementa el Ca, Fe, Mg, S y el P. El k se mantiene sin cambios considerables. En tanto que se reduce el Cl.

Estudio bioquímico

Se presentan enseguida los resultados bioquímicos, para conocer la densidad de fosfatasa alcalina en el suero de la sangre, como función del tiempo. Este estudio se llevó a cabo con un equipo portátil para análisis bioquímicos, (VITROS 60 DE JONSON & JONSON). En las tablas 6.3 y 6.4 se presentan los resultados tanto para el grupo control, como experimental.

Tabla 6.3 Distribución de la fosfatasa alcalina como función del tiempo (grupo control)

RATA Nº	PESO [g]	FOSFATASA ALCALINA [µg/l]	VALOR PROMEDIO [µg/l]	DIAS
1	500	94	129	7
2	520	157		
3	375	120		
4	425	145		
1	375	280	225	14
2	450	133		
3	475	219		
4	430	164		
5	500	329		
1	455	395	321	21
2	500	325		
3	450	226		
4	525	338		
1	450	200	236.75	28
2	575	146		
3	535	248		
4	450	353		

Tabla 6.4 Distribución de la fosfatasa alcalina como función del tiempo (grupo experimental)

RATA N^o	PESO [g]	FOSFATASA ALCALINA [μg/l]	VALOR PROMEDIO [μg/l]	DIAS
1	450	122	163	7
2	450	228		
3	450	170		
4	410	132		
1	425	196	183.75	14
2	430	208		
3	450	177		
4	500	154		
1	350	249	180.75	21
2	425	143		
3	425	147		
4	500	184		
1	375	172	181	28
2	450	183		
3	500	200		
4	410	170		
1	500	140	112.5	35
2	510	106		
3	510	78		
4	550	126		

En la búsqueda bibliográfica se obtuvo el espectro de absorción de piel humana, tanto de personas caucásicas, como negras y se muestran en la figura 6.9

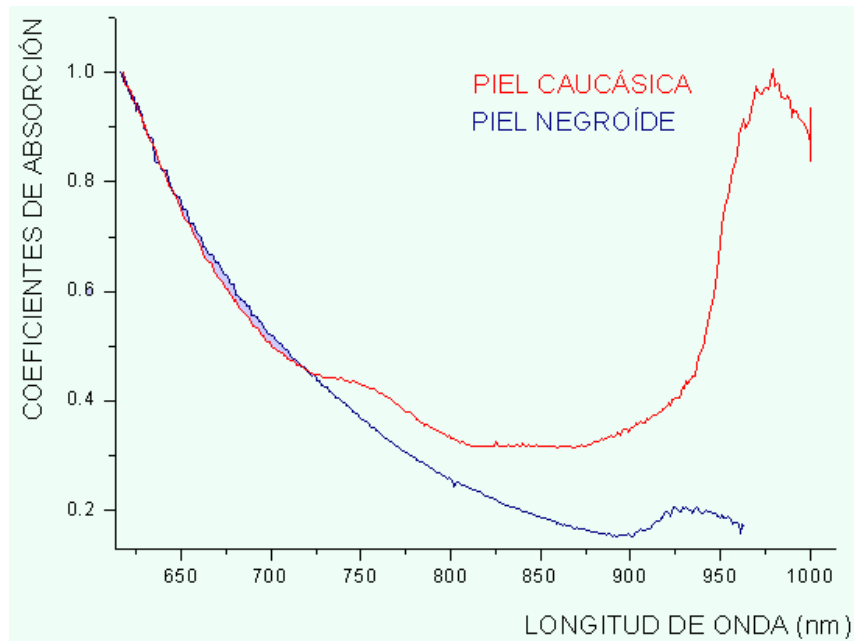


Figura 6.9 Espectros de absorción de piel humana.

De estas últimas gráficas se puede deducir que el diodo láser con longitud de onda 830 nm, puede servir también en aplicaciones en humanos. Tales como el estímulo de la consolidación ósea. Es claro que el color de la piel es una propiedad óptica importante, ya que a partir de los 725 nm para la piel negra, se tiene una mayor transmisión de la luz, en el rango de 725- 950 nm aproximadamente, que para piel blanca. Esto implica que en el caso de personas blancas, su piel sea más sensible a la radiación infrarroja y los efectos de la insolación, que en personas de color.

CAPÍTULO 7



MODELOS DEL INCREMENTO DEL CALLO ÓSEO.

En este capítulo se presentan dos modelos matemáticos de la consolidación ósea y de los resultados obtenidos en el estudio de microscopía electrónica se proponen otros dos modelos.

CAPÍTULO 7

FUNCIÓN DE RELACIÓN DEL INCREMENTO DEL CALLO ÓSEO Y VARIABLES EVALUADAS

7.1 MODELOS DE LA CONSOLIDACIÓN ÓSEA.

Definición:

La consolidación se logra cuando los elementos que constituyen un hueso, están presentes en la misma proporción que antes de que sucediera el traumatismo.

Una correspondencia entre propiedades mecánicas y fisicoquímicas, del hueso fracturado en función del tiempo, puede permitir predecir niveles de confiabilidad y de diagnóstico. Un modelo real del proceso de la consolidación ósea, es complejo y probablemente imposible de llevar a cabo debido al gran número de variables que intervienen y la interrelación que guardan muchas de ellas entre sí. Por esto en el mejor de los casos solamente se han hecho aproximaciones, tomando en cuenta suposiciones que no necesariamente son reales, pero que de otra manera harían difícil el solo plantearlo.

La consolidación ósea desde el punto de vista matemático se puede entender como una función de campo, dependiente de variables, que a su vez pueden ser dependientes tanto del tiempo $Y = Y[s_1(t), s_2(t), s_3(t), \dots, s_n(t)]$, o bien de otro parámetro por ejemplo el número de esfuerzos o ciclos de carga a los que se someta un hueso $Y = Y[s_1(v), s_2(v), s_3(v), \dots, s_n(v)]$. De esta forma es posible pensar en una diferencia de estados, por tanto en una función error que nos permita en un momento dado, decidir cual es el porcentaje de consolidación.

7.1.1 Modelos matemáticos.

En seguida se presentan dos modelos matemáticos, que tratan de explicar la remodelación ósea, desde el punto de vista mecánico. El primero al considerar la remodelación ósea como función directa de estímulos mecánicos y el segundo define la remodelación como función directa de la densidad mineral. El estudio de estos trabajos sirvió para tener una idea clara de cómo se debería proponer un modelo a partir de los resultados obtenidos.

En el primer caso, Beaupre [1] presenta la remodelación ósea como un estado dependiente del tiempo. Para este trabajo toma en cuenta, el hecho de que hay dos tipos de remodelación: una interna y otra externa y que ocurren en forma simultánea. Supone que la geometría es fija y sus propiedades cambian con el tiempo.

El punto de partida de este trabajo, de acuerdo a la teoría de remodelación del hueso, es la necesidad de un cierto nivel de estímulos mecánicos, para mantenerse, el mismo. Si el tejido óseo experimenta un estímulo adicional, se favorece la osteogenesis. Si hay una deficiencia de estímulos se tendrá una resorción. Así el modelo propuesto es el siguiente:

$$\psi_b = \sum_{\text{día}} (n_i \bar{\sigma})^m$$

Donde:

ψ_b = Función consolidación ósea.

n_i = Número de ciclos de carga

$\bar{\sigma}$ = nivel continuo de esfuerzos efectivo definido como $\bar{\sigma} = \sqrt{2EU}$

Donde:

E = modulo promedio de elasticidad.

U = densidad de energía continua de deformación.

m = constante empírica.

Esta representación de niveles continuos puede ser escrita de la siguiente forma:

$$\psi_b = (\rho_c/\rho)^2 \psi_h$$

Donde:

ρ_c = densidad de hueso cortical (el cual se supone igual a la densidad de hueso mineralizado)

ρ = densidad aparente (masa de tejido mineralizado, por volumen de tejido total).

Si la razón total de cambio de densidad aparente es cero, se supone hay una condición de equilibrio. En este caso, el nivel de estímulos de esfuerzos ψ_b es aproximadamente igual a una constante, la cual se llama el estado de estímulos de la consolidación ψ_h , es decir: $\psi_b \cong \psi_h$

El estado actual puede fluctuar, en torno del estado de consolidación y tener una condición de equilibrio. En la vecindad del estado de consolidación se tiene:

$$\rho_h = K_h [\psi_h]^{1/2}$$

Donde:

$K_h = [(\rho_c)^2/\psi_h]^2$ es la constante de consolidación ósea.

Debido a una serie de características propias de cada persona, así como agentes externos, tales como drogas, es posible que el nivel de consolidación no se alcance en forma simultanea, en personas diferentes, ni aún en diferentes huesos del mismo individuo. En tales condiciones se define el error del nivel de remodelación e como: $e = \psi_b - \psi_h$

En esta forma el error de remodelación representa la diferencia entre dos estados, y el porcentaje del avance de la consolidación esta definido como: $[e/\psi_b] \times 100$

En el siguiente modelo, Chakkalakal y colaboradores [2] llevaron a cabo un estudio en perros para conocer la rigidez flexionante, de sus radios sometidos a osteotomías y las siguientes propiedades físicoquímicas: densidad mineral, densidad de la matriz y razón de minerales a la matriz ósea. El error estimado al aplicar la fuerza, lo consideran del 1 %.

Para determinar la rigidez, se efectuaron ensayos a flexión a cuatro puntos, del radio izquierdo y el radio derecho sirvió de control. La razón de la rigidez de ambos radios sirvió para evaluar el avance de la consolidación de la fractura ósea.

Para conocer la densidad de tejido se tomo en cuenta el principio de Arquímedes .

$$\rho_{R,L} = \left[\frac{W}{V} \right]_{R,L}$$

Donde:

W = Es el peso del tejido seco.

W' = Peso del tejido y agua.

V = W - W' Es la diferencia de volumen apreciada al colocar el tejido en agua.

Para conocer la razón de la densidad mineral, la densidad de la matriz ósea a la matriz, el fragmento de tejido se seco en etanol, por 24 horas y se liofilizo a un peso W_d. Las cenizas W₁ se determinaron después de calentar la matriz en un horno a 600 °C. El peso de la matriz W₂ se obtuvo usando la siguiente relación:

$$W_2 = W_d - W_1$$

La densidad de los componentes (análogas a la densidad del tejido) se determino como:

$$(\rho_1)_{R,L} = \left[\frac{W_1}{V} \right]_{R,L}$$

$$(\rho_2)_{R,L} = \left[\frac{W_2}{V} \right]_{R,L}$$

Donde:

ρ_1 y ρ_2 = las densidades minerales y de la matriz ósea respectivamente.

Similarmente la razón de la densidad mineral a la matriz se determinó como: $\mu_{R,L} = \left[\frac{W_1}{W_2} \right]_{R,L}$

De esta forma es posible en función de la densidad de minerales conocer el avance de la consolidación ósea, como función del tiempo.

Posteriormente el autor señala que se hicieron estudios biomecánicos para determinar

densidades y rigidez.

7.1.1 Modelos propuestos.

A partir de los datos obtenidos en el estudio de microscopía electrónica es posible proponer modelos la consolidación ósea.

Para este estudio por cuestiones de costo y tiempo, del análisis de microscopía electrónica, solamente, se determinaron ocho elementos de la tabla periódica, que intervienen en la formación del callo óseo. Se consideran para este modelo dos vectores, en un espacio cartesiano, de ocho variables. $H_n = H_n(\text{Ca}, \text{Cl}, \text{Fe}, \text{K}, \text{Mg}, \text{Na}, \text{P}, \text{S})$, donde cada variables es a su vez función del tiempo:

$$H_n = H_n(\text{Ca}(t), \text{Cl}(t), \text{Fe}(t), \text{K}(t), \text{Mg}(t), \text{Na}(t), \text{P}(t), \text{S}(t)),$$

$$H_D = H_n(\text{Ca}(t), \text{Cl}(t), \text{Fe}(t), \text{K}(t), \text{Mg}(t), \text{Na}(t), \text{P}(t), \text{S}(t))$$

Donde:

H_n = Es el estado de un hueso normal.

H_D = Es el estado de un hueso para cualquier día antes de la consolidación.

Una representación de este modelo puede verse en la figura 7.1

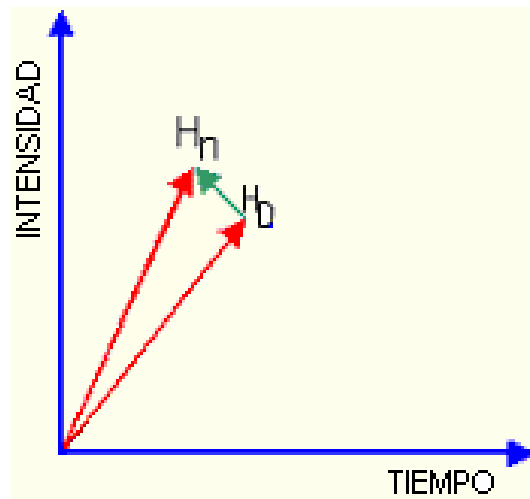


Figura 7.1 Modelo de la consolidación ósea.

Lo que se espera de manera intuitiva es que H_D al transcurso del tiempo, se aproxime más a H_n . De esta manera se tiene:

$$H_{\text{normal}} - H_{\text{Día}} = H_{\text{consolidación}}$$

Donde:

$H_{\text{consolidación}}$ = Es el estado que corresponde a la consolidación, como función del tiempo.

Así se espera que la norma de $H_{\text{consolidación}}$ fuese cero, cuando se ha alcanzado la remodelación, que es la etapa final de la recuperación de una fractura ósea.

$$\sum_{i=1}^n c_i \cdot \alpha_i = H_{\text{consolidación}}$$

Donde:

c_i = elementos que intervienen en la formación del callo y

α_i = constantes

De esta forma la norma de H_{con} puede acotarse a un valor ε . Así se tiene

$$H_{\text{consolidación}} < \varepsilon$$

Otro modelo propuesto es el siguiente:

Al tomar en cuenta los resultados obtenidos del estudio de microscopia electrónica de barrido ambiental (TABLAS 6.1 y 6.2 de este trabajo) se propone una función $F(t)$ para cada elemento, de tal forma que $F(x_i(t)) = y_i$.

Una solución aceptable es un polinomio de Lagrange, para cada elemento x_i . Ahora bien puesto que se tomaran en cuenta $n+1$ puntos el polinomio debe ser de grado n ,

Entonces $F(x_i) = P_n(x) + R_n(x)$

Donde $P_n(x)$ es el polinomio que se aproxima a $F(x_i)$, y esta dado como:

$$P_n(x) = \sum_{k=0}^n y_k \frac{(x-x_0)\dots(x-x_{k-1})(x-x_{k+1})\dots(x-x_n)}{(x_k-x_0)\dots(x_k-x_{k-1})\dots(x_k-x_n)}$$

$$P_n(x) = \sum_{i=0}^n \alpha_i \cdot y_i$$

Donde cada α_i es un coeficiente de un polinomio de interpolación de Lagrange y esta dado

$$\text{como: } \alpha_i(x) = \frac{(x-x_1)(x-x_2)\dots(x-x_{n-1})}{(X_n-x_1)(x_n-x_2)\dots(x_n-x_{n-1})}$$

De esta forma $F(x_i) \approx P_n(x)$

Al sustituir los valores de la tabla 6.1 se tiene:

$$Ca(t) = (t-7)(t-14)(t-21)(t-28)(604.9 \times 10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t-21)(t-28)(2190 \times 10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(3499x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(2350x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(538.7x10^{-6})$$

$$Cl(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(1.344x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(60.04x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(14.605x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(3.352x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(13.32x10^{-6})$$

$$Fe(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(5.0499x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(6.2473x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(13.588x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(5.122x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(1.3796x10^{-6})$$

$$K(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(2.2612x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(17.041x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(27.124x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(17.263x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(3.9827x10^{-6})$$

$$Mg(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(5.154x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(75.836x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(96.235x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(27.981x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(5.0898x10^{-6})$$

$$Na(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(4.0976x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(19.505x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(30.351x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(76.28x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(23.506x10^{-6})$$

$$P(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(295.9x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(1050x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(1670x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(1110x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(278.8x10^{-6})$$

$$S(t) = (t - 7)(t - 14)(t - 21)(t - 28)(2.663x10^{-6}) + (t^2 - 14t)(t - 21)(t - 28)(32.0350x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 21)(t - 28)(76.41x10^{-6}) +$$

$$(t^2 - 7t)(t - 14)(t - 28)(1.736x10^{-6}) + (t^2 - 7t)(t - 14)(t - 21)(3.86x10^{-6})$$

REFERENCIAS.

1. G. S. Beaupre, An approach for time-dependent bone modelling and remodelling theoretical development, *J. Orthop. Res*, 18(5); 651-661
2. D. A. Chakkalakal, L. Lippiello, R.f. Wilson, R. Shindell, J. F. Conolly, Mineral matrix contributions to rigidity in fracture healing, *J. Biomechanics*, 1990, Vo 23, No 5, 425-434

APÉNDICE



PROGRAMA PARA EL FUNCIONAMIENTO DEL ESTIMULADOR LÁSER.

En esta sección final se presenta el programa, con el cual funciona el estimulador láser.

PROGRAMA DEL MICROPROCESADOR PIC16F874

```
#INCLUDE<P16F874.INC>

__CONFIG __XT_OSC & __WDT_OFF & __PWRTE_ON & __CP_OFF &
_DEBUG_OFF & __WRT_ENABLE_ON & __LVP_OFF & __CPD_OFF & __BODEN_OFF

CBLOCK  H'30'

RETAR1

RETAR2

TIMEP

TIME

REGBT

REGBT2

REGUS

REGUS2

REGDS2

REGDS

BAND

REPITE

ENDC

;*****

ORG 00

GOTO  INICIO

ORG 04

GOTO  INTERRUPT

INICIO  BSF  STATUS,RP0

        BCF  STATUS,RP1

        MOVLW  B'00001100'
```


**MOVWF TRISA ;PUERTOS DE SALIDA FRECUENCIAS Y
ENTRADAS**

MOVLW B'00000000'

MOVWF TRISB ;PUERTOS DE SALIDAS DISPLAY

MOVLW B'00000000' ; ENTRADAS INFORMACION

MOVWF TRISC

BCF STATUS,RP0

MOVLW B'00000000' ;1:1 y B'00100000' 1:4

MOVWF T1CON

CLRF TMR1H ;REGISTROS

CLRF TMR1L ;UTILIZAR PARA COMPARAR COMPARADOR

1.

MOVLW B'01001001' ;COMPARADOR 2.

MOVWF T2CON

MOVLW D'250'

BSF STATUS,RP0

MOVWF PR2

BCF STATUS,RP0

CLRF TMR2

MOVLW B'00001011' ;Configura comparador

MOVWF CCP1CON

CLRF PIR1 ;Limpia todas las banderas.

BSF STATUS,RP0

MOVLW B'00000110'

MOVWF PIE1

MOVLW B'00000110'

MOVWF ADCON1

BCF STATUS,RP0

```

MOVLW    B'11000000' ;Importante puerto A I/O Digitales.
MOVWF    INTCON

CLRF REGDS2
CLRF REGUS2
CLRF REGBT2
CLRF TIMEP
CLRF RETAR1
CLRF RETAR2
CLRF REGBT          ;REGISTRO DE TIEMPO

MOVLW    H'23'      ;50
MOVWF    CCPR1L      ;REGISTROS
MOVLW    H'8'       ;C3
MOVWF    CCPR1H      ;REGISTROS CON VALOR A COMPARAR
PARA Interrupción cada 0.05 seg.
                ;Con 823 Interrupción cada 0.00208333 seg.
;**** SELECCION DE FRECUENCIA: 1-6HZ, 2-12HZ, 3-24 HZ, 4-60HZ, 5-120 HZ, 6-
240 HZ ****
BCF  PORTA,5
BCF  PORTC,3
BSF  PORTA,0
BCF  PORTA,1
MOVLW    D'1'
MOVWF    BAND
CLRF PORTB
SELECT
BTFSS    PORTA,2          ;Incrementa en 1 BAND cada vez que se

```

oprime botón.

```
GOTO UNO  
INCF BAND,F
```

```
CATCH BTFSS PORTA,2 ;Para evitar que se incremente  
infinitamente.
```

```
GOTO UNO  
NOP  
NOP  
NOP  
GOTO CATCH  
UNO MOVF BAND,W  
SUBLW D'1'  
BTFSS STATUS,Z  
GOTO DOS  
GOTO FREC_1
```

```
DOS MOVF BAND,W  
SUBLW D'2'  
BTFSS STATUS,Z  
GOTO TRES  
GOTO FREC_2
```

```
TRES MOVF BAND,W  
SUBLW D'3'  
BTFSS STATUS,Z  
GOTO CUATRO
```

```

        GOTO    FREC_3
CUATRO  MOVF    BAND,W
        SUBLW   D'4'
        BTFSS  STATUS,Z
        GOTO    CINCO
        GOTO    FREC_4

```

```

CINCO   MOVF    BAND,W
        SUBLW   D'5'
        BTFSS  STATUS,Z
        GOTO    SEIS
        GOTO    FREC_5

```

```

SEIS    MOVF    BAND,W
        SUBLW   D'6'
        BTFSS  STATUS,Z
        GOTO    DEFAULT
        GOTO    FREC_6

```

```

DEFAULT MOVLW   D'1'
        MOVWF  BAND
        GOTO   SELECT

```

;***** DEFINICIÓN DE FRECUENCIAS *****

```

FREC_1
        MOVLW  D'40'
        MOVWF  REPITE
        MOVLW  B'00001110'
        MOVWF  PORTB
        MOVLW  D'1'

```

MOVWF BAND
GOTO ESPERA

FREC_2

MOVLW D'20'
MOVWF REPITE
MOVLW B'01111011'
MOVWF PORTB
MOVLW D'2'
MOVWF BAND
GOTO ESPERA

FREC_3

MOVLW D'10'
MOVWF REPITE
MOVLW B'01011111'
MOVWF PORTB
MOVLW D'3'
MOVWF BAND
GOTO ESPERA

FREC_4

MOVLW D'4'
MOVWF REPITE
MOVLW B'11001110'
MOVWF PORTB
MOVLW D'4'
MOVWF BAND
GOTO ESPERA

FREC_5

```

MOVLW    D'2'
MOVWF    REPITE
MOVLW    B'11011101'
MOVWF    PORTB
MOVLW    D'5'
MOVWF    BAND
GOTO    ESPERA

```

FREC_6

```

MOVLW    D'1'
MOVWF    REPITE
MOVLW    B'11111101'
MOVWF    PORTB
MOVLW    D'6'
MOVWF    BAND
GOTO    ESPERA

```

ESPERA

```

BTFSS    PORTA,3
GOTO     SELECT

```

CATCH1 **BTFSS** **PORTA,3** **;Para evitar que se incremente infinitamente.**

```

GOTO     BRINCA
NOP
NOP
NOP
GOTO     CATCH1

```

;*** SELECCION DEL TIEMPO DE DURACIÓN *******

```

BRINCA    BCF    PORTA,5
          BCF    PORTA,0
          BCF    PORTC,3
          BSF    PORTA,1
          MOVLW   D'1'
          MOVWF   BAND
          CLRF   PORTB

SELECT1
          BTFSS   PORTA,2           ;Incrementa en 1 BAND cada vez que se
                                     oprime botón.
          GOTO    UNOT
          INCF   BAND,F

CATCH2    BTFSS   PORTA,2           ;Para evitar que se incremente
                                     infinitamente.
          GOTO    UNOT
          NOP
          NOP
          NOP
          GOTO    CATCH2
UNOTMOVF   BAND,W
          SUBLW   D'1'
          BTFSS   STATUS,Z
          GOTO    DOST
          GOTO    FREC_1T

DOSTMOVF   BAND,W
          SUBLW   D'2'

```

```

    BTFSS    STATUS,Z
    GOTO     TREST
    GOTO     FREC_2T
TREST    MOVF     BAND,W
    SUBLW   D'3'
    BTFSS   STATUS,Z
    GOTO    CUATROT
    GOTO    FREC_3T
CUATROT  MOVF     BAND,W
    SUBLW   D'4'
    BTFSS   STATUS,Z
    GOTO    CINCOT
    GOTO    FREC_4T

CINCOT   MOVF     BAND,W
    SUBLW   D'5'
    BTFSS   STATUS,Z
    GOTO    DEFAT
    GOTO    FREC_5T
DEFAT    MOVLW   D'1'
    MOVWF   BAND
    GOTO    SELECT1

```

******* DEFINICIÓN DE FRECUENCIAS *******

```

FREC_1T
    MOVLW   D'3'
    MOVWF   TIME

```



```
MOVLW    B'00001110'  
MOVWF    PORTB  
MOVLW    D'1'  
MOVWF    BAND  
GOTO     ESPERA1
```

FREC_2T

```
MOVLW    D'6'  
MOVWF    TIME  
MOVLW    B'01111011'  
MOVWF    PORTB  
MOVLW    D'2'  
MOVWF    BAND  
GOTO     ESPERA1
```

FREC_3T

```
MOVLW    D'9'  
MOVWF    TIME  
MOVLW    B'01011111'  
MOVWF    PORTB  
MOVLW    D'3'  
MOVWF    BAND  
GOTO     ESPERA1
```

FREC_4T

```
MOVLW    D'12'  
MOVWF    TIME  
MOVLW    B'11001110'  
MOVWF    PORTB  
MOVLW    D'4'
```

```

MOVWF BAND
GOTO ESPERA1
FREC_5T
MOVLW D'15'
MOVWF TIME
MOVLW B'11011101'
MOVWF PORTB
MOVLW D'5'
MOVWF BAND
GOTO ESPERA1
ESPERA1
BTFSS PORTA,3
GOTO SELECT1
BCF PORTA,5 ;Apagamos los leds para mayor energía de salida.
BCF PORTA,0
BCF PORTA,1

BSF T1CON,TMR1ON ;Se enciende comparador 1
BSF T2CON,TMR2ON ;Permanecerá apagado comparador 2.
BUCLE GOTO BUCLE
;***** INICIA SECUENCIA DE OSCILADOR *****

INTERRUPT BTFSS PIR1,CCP1IF ;En esta parte preguntamos si el
modulo CCP1

GOTO CONTINT ;fue el responsable de provocar la
interrupción,

;sí fue él entonces comenzamos. de lo

BCF PIR1,CCP1IF ;contrario nos dirigiremos a la parte

```

CONTINT, ya sea INCF REGBT,F
;para preguntar por otras interrupciones o
simplemente

MOVF REPITE,W ;para salirnos.

SUBWF REGBT,W

BTFSS STATUS,Z

RETFIE

CLRF REGBT

BTFSS PORTA,5 ;Salida de oscilador

GOTO PRENDER

BCF PORTA,5

RETFIE

PRENDER BSF PORTA,5

RETFIE

;***** Contador de tiempo de duración. Comparador 2. *****

CONTINT

BTFSS PIR1,TMR2IF ;PREGUNTAMOS POR BANDERA

GOTO CONTINT1

BCF PIR1,TMR2IF

INCF REGBT2,F ; 1 Segundo

MOVLW D'100'

SUBWF REGBT2,W

BTFSS STATUS,Z

RETFIE

CLRF REGBT2

INCF REGUS2,F ;1 Minuto

MOVLW D'60'

```

SUBWF    REGUS2,W
BTFSS   STATUS,Z
RETFIE
CLRF REGUS2
INCF REGDS2,F
MOVF    TIME,W
SUBWF   REGDS2,W
BTFSS   STATUS,Z
RETFIE
CLRF REGDS2
BCF  T1CON,TMR1ON ;Se apaga comparador 1.
BCF  T2CON,TMR2ON ;Se apaga comparador 2.
BCF  PORTA,5
GOTO  FIN

```

```
CONTINT1 RETFIE
```

```
FIN
```

```
***** Con esta rutina se logrará enviar señales de reloj *****
```

```
;ETIUM1      BTFSS      PORTC,3
```

```
;          GOTO  PRENDER1
```

```
;          BCF  PORTC,3
```

```
;          RETFIE
```

```
;PRENDER1 BSF  PORTC,3
```

```
;          RETFIE
```

```
*****
```

```
END
```

CONCLUSIONES



Se presenta en esta sección una explicación de avances y resultados alcanzados en este trabajo.

CONCLUSIONES

Un trabajo metodológico es la diferencia, entre conocer resultados esperados y sólo esperar para conocer lo sucedido.

En esta sección se discuten no solo los resultados, sino también la metodología, de tal forma que se explica la forma en que se podrían mejorar trabajos futuros.

La forma de hacer la fractura, fue uno de los principales problemas técnicos . Una solución fue hacer uso de una máquina diseñada para este fin []. Al aplicar la carga a las tibias efectivamente se fracturaban bien cuando las ratas estaban en un rango de peso aproximado a los 250 g, pero para pesos de 300 g o mayores la estructura muscular se comporta como un amortiguador al impacto y solamente se provocaba la inflamación de la extremidad. O en otros casos la fractura no se hacía en el sitio deseado, o como se esperaba. Por este motivo se cambió de técnica y se decidió por una incisión de 5 mm. Y a través de ella hacer la fractura de una forma más controlada por medio de una segueta de joyero. Esta es la misma técnica descrita por luger en su artículo.

el trazo de fractura se efectuó en un principio en la mitad de la diafisis de la tibia derecha de cada rata de estudio, de acuerdo al trabajo de luger. en este caso se observó un retraso considerable en el avance de la consolidación, con respecto a otras investigaciones reportadas, por ejemplo los de baranauska y de freitas [1, 2], fue esta la razón por la cual se decidió por cambiar su localización

la consolidación es función directa de la localización de la fractura. de esta observación se encontró que una respuesta más rápida, en ambos grupos de estudio se obtiene al fracturar 4 mm por debajo de la meseta tibial.

El punto de partida fue la lectura de los artículos de Lugar y Trelles [3, 4], donde señalan que es posible la reducción del tiempo de consolidación ósea, como consecuencia de una terapia láser. Sin embargo aún cuando efectivamente se encontraron buenos resultados, es probable que el tiempo pudo reducirse, pero influyeron las siguientes causas:

- De acuerdo a la teoría de remodelación de wolff, el hueso se remodela en función de los esfuerzos a los que son sometidos, de tal forma que para que consolide y posteriormente se remodele un hueso, es preciso tomar en cuenta los esfuerzos mecánicos aplicados. sin embargo si existe dolor, es probable que el tiempo de deambulacion se retrase. tal es el caso de las ratas de este trabajo, a ninguna se les proporciono algún analgésico. esto debido a que se esperaba que no existiera la posibilidad de que algún medicamento interfiriera en los resultados. además de que en los trabajos reportados, que se tomaron de referencia tampoco se mencionó la aplicación de analgésicos. posterior a la cirugía, ya que de alguna forma esto puede alterar el proceso de osteogénesis. en los trabajos atentes mencionados no se dice si aplicaron un medicamento para el dolor y fue la razón por la cual tampoco se uso en la

presente investigación.

- Aún cuando se fijaron los extremos con un alambre de kirschner, para simular un clavo centromedular, es muy probable, que existieran micromovimientos en un plano transversal, al eje de la tibia. esto dio como resultado una pseudo artrosis, o consolidación viciosa, es decir se forma un callo, pero difícilmente se llega a osificar. tampoco se les colocó un fijador para evitar movimientos de rotación, lo cual posiblemente, también influyó para tener movimientos no controlados. la razón por la cual no se dispuso de tornillos o elementos para evitar rotaciones, fue por las dimensiones de las tibias. lo que hace difícil la colocación de clavos o cualquier dispositivo de fijación. además tampoco les aplico, en sus animales.

En todos los artículos reportados en la literatura especializada, solamente se menciona el tipo de láser usado, pero de ninguna manera, se explica la forma de elegir un láser. una aportación a la investigación tanto clínica como experimental es el método para decidir la elección de un láser. consiste en definir el espectro de absorción óptica, del tejido que se desea estudiar. de este espectro según sea la aplicación se decide, si es superficialmente puede ser alguno de la región visible, o bien si se desea hacer una estimulación en regiones profundas, la opción está en la región infrarroja.

Por otra parte la densidad de energía es un parámetro muy importante, que debe ser considerado, ya que independientemente de la potencia del láser la energía que se espera aplicar es la misma. para elegir esta dosis hay dos opciones: una es hacer grupos pilotos, experimentales e irradiarlos a diferentes dosis. posteriormente de acuerdo a la ley de arndt-schultz, determinar el grupo de estudio. una segunda opción es hacer una revisión bibliográfica.

Una forma posible para mejorar la investigación es trabajar con conejos, en lugar de ratas, ya que el diámetro de las tibias es mayor y de esta manera es posible colocar algún tornillo cortical, para reducir micromovimientos.

Al concluir esta investigación, se puede afirmar que los estudios fotoacústicos proporcionan una relación bien definida, entre aspectos ópticos y estadios de la consolidación ósea. Esto es de gran importancia ya que en la literatura especializada no hay trabajos reportados, que traten el aspecto de la osteogénesis, desde el punto de vista de la fotoacústica. El hecho de que se pueda tener una relación entre aspectos ópticos y biomecánicos, da la posibilidad de investigar en el diseño de instrumentación tanto para el diagnóstico como para la terapia en el tratamiento de fracturas. Esto es posible debido a que conforme el callo se mineraliza, se modifica el espectro de absorción óptica, de forma tal, que solamente cambia la intensidad de picos de longitudes de onda característicos, como se muestra en la figura.

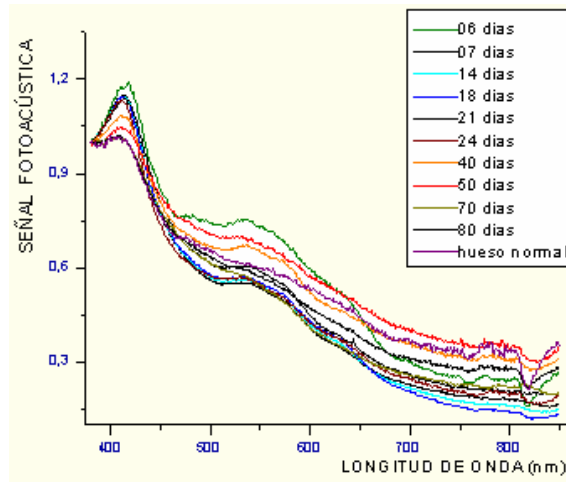


Figura 1 Gráfica del espectro característico de absorción óptica, de huesos fracturados.

Una posible aplicación de este estudio está en el diseño de instrumentación para el diagnóstico del avance de la consolidación de forma no invasiva, con un nivel de confiabilidad aceptable.

Del estudio de bioquímica, para determinar la densidad de fosfatasa alcalina en suero, se puede concluir que la enzima alcanza su nivel máximo, al día 21 en el grupo control mientras, que en el grupo experimental, sometido a radiación láser se obtiene al día 14. Este resultado esta de acuerdo con los resultados publicados por que implica una reducción en el tiempo del 34 %, esto esta de acuerdo con lo que se reporta en la literatura . Ver figura 2

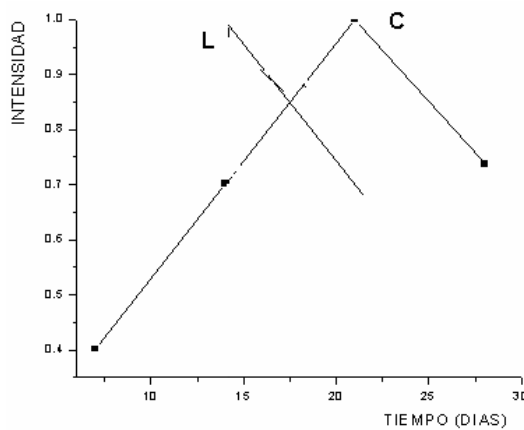


Figura 2 Gráfica de la distribución de la fosfatasa alcalina óptica, de huesos fracturados.

La distribución de minerales y otros elementos encontrados en el estudio de microscopía electrónica, tanto para el grupo control como experimental, se puede determinar como función del tiempo. Para ello se han encontrado relaciones funcionales, para cada elemento encontrado en el análisis de microscopía electrónica. De esta forma es posible definir, desde el punto de vista matemático la consolidación como una función de campo, es decir depende del valor que cada variable toma en el tiempo. Una expresión matemática de la consolidación puede ser útil para un médico ortopedista si desea tener una idea del porcentaje de consolidación que ha avanzado un paciente. Gracias al estudio de microscopía electrónica fue posible tomar microfotografías y de esta manera poder conocer como evoluciona el callo de la fractura, desde que se forman puentes y se inicia un callo blando hasta su osificación. Conocer esta evolución osteogénica, como función del tiempo, es prácticamente imposible, a menos que se tomen intervalos de tiempo más grandes.

El equipo que se desarrollo se utilizó en forma continua, pero tiene la posibilidad de proporcionar una combinación con seis frecuencias y cinco tiempos. Es posible obtener una potencia útil de 30 mW, aún cuando el diodo láser, tiene las características para obtener una potencia mayor, no fue posible debido a que se necesita modificar el circuito driver (control de potencia al diodo láser) o bien conseguir otro integrado. En este diseño se acepto la configuración del driver propuesto por la empresa *SANYO*, sin embargo no se observa un buen control de corriente al diodo láser. Es esta la razón por la cual la mejor opción es tomar en cuenta los integrados de la empresa *MAXIM*.

No fue problema para continuar la investigación, debido a que lo importante no es la potencia, sino la longitud de onda y el tiempo de exposición, para obtener la energía de irradiación deseada.

Con excepción del estudio biomecánico se encontró una reducción en el tiempo de consolidación, en los otros estudios.

Al comparar la terapia láser con otras se pude decir lo siguiente: Es una terapia que ofrece grandes ventajas, si se seleccionan correctamente a los pacientes. De ninguna manera puede decirse que es mejor a otras.

En la siguiente ilustración se muestra una tabla comparativa de otras de las más conocidas terapias que actualmente se usan para la estimulación de la osteogénesis.

TABLA 4.1 Cuatro métodos de estimulación, de la consolidación de la fractura.

TIPO DE ESTIMULACIÓN	TIEMPO DE APLICACIÓN DIARIO	CARACTERÍSTICAS
ELECTRICO	POR TIEMPOS PROLONGADOS, PUEDEN SER 3 O MÁS SEMANAS.	INVASIVO, AUNQUE HAY LA POSIBILIDAD DE APLICAR CAMPOS ELÉCTRICOS EN FORMA CAPACITIVA.
CAMPOS MAGNETICOS	APROXIMADAMENTE. 10- 14 HORAS DIARIO TIEMPOS LARGOS DE APLICACIÓN SEGÚN LA PATOLOGÍA.	NO ES INVASIVO
MECÁNICO	APROXIMADAMENTE 30 min ---A 1hr DIARIO--- NO EXISTEN EQUIPOS COMERCIALES, SIN EMBARGO, EL ESTIMULO SE PUEDE DAR , AL CAMINAR...SEGÚN LO DECIDA EL MEDICO.	NO ES INVASIVO. YA QUE ES UN ESTIMULO NATURAL.
LÁSER	APROXIMADAMENTE 5-15 min/DIARIOS----- HASTA POR 5 SEMANAS... PUEDE SER MAYOR SEGÚN LA PATOLOGÍA.	NO ES INVASIVO

Photoacoustic and SEM analysis of fracture bone callus to different consolidation times

P. A. Lomelí Mejía¹, G. Urriolagoitía Calderón², J.L. Jiménez Pérez³, A. Cruz Orea⁴
L. H. Hernández Gomez², H. Lecona Butron¹.

¹Centro Nacional de Rehabilitación y Ortopedia, Calz. México-Xochimilco # 289, Col. Arenal de Guadalupe c.p. 14389-México D.F.

E-mail: palm7@hotmail.com

²IPN SEPI-ESIME, Departamento de Mecánica, Zacatenco, México, D.F.

³CICATA-IPN, Legaria 694, Col. Irrigación, 11500 México D.F., México

jjimenezp@fis.cinvestav.mx

⁴Departamento de Física, CINVESTAV-IPN, A.P. 14-740, 07300 México D.F., México

Abstract. The Photoacoustic Spectroscopy (PA) and Scanning Electron Microscopy (SEM) were used to perform a study of fractured bone callus to different times of consolidation. There were obtained optical absorption spectra and pictures of male rat fractured bones at different consolidation times. From these spectra it was possible to observe the presence of p-Nitrophenylphosphatase, characteristic phosphatase in rat fractured bones through their absorption peaks which were compared with characteristic reported peaks in the literature for this phosphatase. In this study we showed that p-Nitrophenylphosphatase could be considered as an indicator of the repair process of bone fractures. Through of the complementary SEM analysis it was possible to obtain different pictures as the callus grows in the time.

1. INTRODUCTION

The consolidation of fractured bones is one of most important issues in orthopedic due that it is possible to analyze and study the growth of the callus around the fracture. For the natural bone consolidation the integration of bone with tissue and corporal liquids, creates bone callus as time passes modifying inside all their chemical, physical and biological properties of tissue-bone system in the fracture. Although when we want to know the advance of consolidation of fractured bones during the early stages it is difficult to do it by using X-ray diffraction due to the fact that the grown cartilage is transparent to X-ray. As an alternative technique to study the consolidation of fractures is used a biochemical procedure where it is possible to use some chemical indicators (for example, alkaline phosphatase and osteocalcine) to follow the time evolution of the osteogenesis [1]. By other hand the study of osteogenesis could be done by a histological study, chemical composition of minerals and also by studying of osea cell growing etc. Through an electronic microscopy study it is possible to take microimages of the fracture crack surface and to observe with some detail the formation of bone callus. Each one of these studies give us different information to evaluate the osteogenesis process without damaging the samples under study. By other hand Photoacoustic spectroscopy (PAS) technique is widely used for diverse applications in different areas. These include studies in material, environmental, and life sciences [2]. The PAS technique is easy to implement, does not require extensive sample, and can be done "in situ". The use of PAS has become an important tool, because it is a nondestructive analytical technique. Furthermore, its use to measure optical absorption spectra has advantages over the usual transmission measurements. One important feature of PAS technique is that scattered light does not disturb the measurements significantly, so that the optical properties of biological sample can be investigated easily and directly with this technique. The use of PAS to measure such absorption spectra has advantages over the usual transmission measurements in which the sample need to be prepared to have good quality surfaces, and also because with PA measurements we can avoid the optical interference effects and obtain well resolved transitions [2].

An alternative way to know the changes during bone consolidation could be done by photoacoustic (PA) analysis of fracture bone callus, at different times of bone consolidation, where it would be possible to obtain the optical absorption spectra at different consolidation stages. Through our PA analysis it was possible to verify the presence of alkaline phosphatase, the main substance which causes the bone consolidation. The alkaline phosphatase (AP) is an enzymatic set, mainly founded in the bone (ALP-2 izoenzyme) [3]. In this paper we report the optical absorption spectra of AP at different consolidation periods of fractured rat bones. Through of the

complementary SEM analysis was possible to obtain different pictures as the callus grows in the time for each one of fractured bones. The combination of PAS with SEM can be helpful to understand better the consolidation of fractured bones.

2. EXPERIMENT

For this study we used twenty Wistar male rats, with 350 gr average weight. The care and feeding were done in agreement with Mexican official standard NOM(Z0066-98). The rats were weighted and then a pentobarbital sodic dose was intraperitoneally applied (50 mg/Kg/P), 5 mm below of apofisis xifoide, where P is the animal weight. It was performed a 3 to 5 mm incision in medial craneum, in the tibia distal third. It was separated the superficial and deep faces with Zen Miller separators. After this it was used a jeweller fretsaw to make the fracture outline, taking care of don't damage other tissues. To stabilize the fracture it was placed a Kirschner wire (0.035 mm stainless steel wire). The final stage in this process was to stitch layer by layer, beginning by periostis, muscle and finally the skin. Later it was cleaned the injury with a saline solution and the rats were placed in polycarbonate cages, with steel lid and allow them free movement. Two rats were sacrificed each six days in order to follow the evolution of the bone consolidation. In our study we take into account only the right tibias of the sacrificed rats also the soft tissues were removed. After this the tibias were dried in a natural way. From the fracture callus, it was removed a fragment (with 3x5 mm approximately size) by using a fretsaw. To analyze the composition and structure of the fracture bone callus the samples were analyzed by photoacoustic spectroscopy (PAS) and Scanning Electron Microscopy (SEM).

2.1 PAS: The optical absorption spectra were obtained in the range 300-950 nm by using a home-made PA spectrometer. The experimental setup consisted of a 1000 W Xenon lamp (Oriel), a variable frequency mechanical chopper, set at 17 Hz, a monochromator, and an air-filled brass cell with a condenser microphone. The PA signal from the microphone provided the input to the signal channel lock-in amplifier (SR-850) which is interfaced to a personal computer, displaying the wavelength-dependent signal amplitude and phase simultaneously. In order to take into account the Xe lamp emission spectrum the PA signal was normalized to the signal obtained from charcoal powder.

2.2 SEM: To obtain the microphotographs where the callus, at different bone consolidation stages is observed it was used SEM technique. The SEM images are obtained from a tube of cathodic rays synchronized with an electron source, which scan the sample surface, this thin electron beam is focused to target some point in the sample, which induces the electron emission (with a wide scatter of energy) from this point of the sample surface, the emitted electrons are collected and amplified to give an electrical signal and then to form the image. Scanning electron microscopy was performed on the samples with a XL-30-ESEM microscope with a point resolution ~ 0.17 nm. From SEM images the sample size was directly measured.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

PA optical absorption spectra of dry fracture bone callus of Wister male rat, were obtained in the range from 350 to 850 nm. For these experiments twenty rats were sacrificed at different bone consolidation times. In order to separate the callus contribution in the PA optical absorption spectra we also obtain the PA spectra of rat bone and blood, then we subtract these spectra from the fractured bone callus spectra. In the resulting PA spectra is possible to see a maximum absorption band in the range of 404-412 nm, which corresponds to absorption range of p-Nitrophenylphosphatase whose presence is characteristic in rat fractured bones [3]. Here the absorption band, corresponding to this alkaline phosphatase, decrease as the callus grows in the time. In Fig. 1 we show the PA average values in the range of 404-412 nm presented as a function of the consolidation time. As we can see these values decrease as function of time after 6 days of the fracture. This behaviour indicates that alkaline phosphatase concentration decrease as the bone is consolidating (and the callus is growing). These results are in agreement with

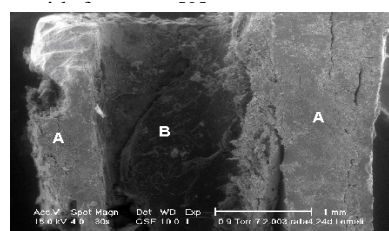
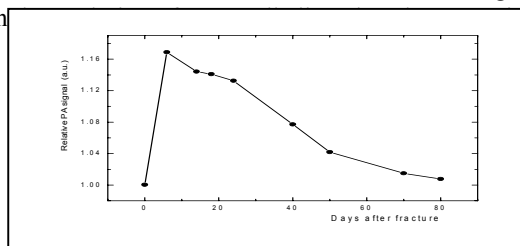


Fig.1

Fig.2

In Fig. 2 shows a SEM micropicture of a fractured rat tibia, after 24 days of fractures where it is possible to observe the presence of the bone callus (region A) and B is the medullar channel. In order to make an complementary analysis between PAS and SEM technique, used to study the consolidation of fractured bones, we describe briefly the consolidation process. First, when a bone is fractured, occurs an inflammation with a significant increase of macrophages, to prevent strange bodies and, lymphosites and monocytes, to avoid haemorrhages. After this fibroblasts and osteoblasts form soft callus and as a consequence alkaline phosphatase, enzymes, proteins and minerals increase their levels until reach a maximum value around 12 days after the fracture. Also in Fig. 1 it is possible to observe, by using PAS, the maxima values of optical absorption in the fractured bone callus as a consequence of the increment of alkaline phosphatase. Finally the bone redesign start and the soft callus is transformed to hard and compact callus which is incorporated to the bone and then finish the bone redesign. In this stage the levels of alkaline phosphatase, enzymes and proteins decrease until their basal levels which are reflected in the final evolution showed in Fig.1 and also by the SEM micropicture of Fig.2.

CONCLUSIONS

By using PAS and SEM techniques we performed a qualitative analysis of the consolidation of fractured bone. This study allows to follow the behaviour of p-Nitrophenylphosphatase from the PA optical absorption spectra of the samples at different consolidation times. Also from SEM micropictures it was possible to correlate this phosphatase with the evolution of the bone callus at different consolidation times.

Acknowledgements

We would like to thank Conacyt, COFAA and CGPI-IPN, México for their partial financial support.

Rereferences

- [1]. O. Akkus, F. Korkusuz, S. Akin, N. Akkas, Proc. Inst. Mech. Eng., 212(5) (1998) 327-336.
- [2]. A. Rosencwaig, A. Gersho, J. Appl. Phys., 47 (1976) 64-88.
- [3]. R. B. McComb, G. N. Bower, Jr. and S. Posen, Alkaline Phosphatase, Plenum Press. New York and London. (1977).

Photoacoustic Spectroscopy Applied to the Study of Bone Consolidation In fractures

P. A. Lomelí Mejía^{1,a}, G. Urriolagoitia², J.L. Jiménez Pérez^{3,b}, L. H. Hernández Gomez², H. Lecona Butron¹, A. Cruz Orea⁴, H. Villegas Castrejón¹, R. Neri Basurto¹.

¹*Centro Nacional de Rehabilitación y Ortopedia,
Calz. México-Xochimilco # 289, Col. Arenal de Guadalupe c.p. 14389-México D.F.*

²*IPN SEPI-ESIME, Departamento de Mecánica, Zacatenco, México, D.F.*

³*CICATA-IPN, Legaria 694, Col. Irrigación, 11500 México D.F., México*

⁴Departamento de Física, CINVESTAV-IPN, A.P. 14-740, 07300 México D.F., México.

^apalm7@hotmail.com, ^bjimenezp@fis.cinvestav.mx.

Keywords: Osteogenesis; Osteotomy; Photoacoustic effect

Abstract. By using photoacoustic (PA) spectroscopy it was performed a study about bone consolidation in fractures. It was obtained the optical absorption spectra of callus of male rat fractured bones at different consolidation times. From these spectra it was possible to observe the presence of alkaline phosphatase through their absorption peaks which were compared with characteristic peaks reported in the literature for this phosphatase. In this study we showed that alkaline phosphatase could be considered as an indicator of the repair process of bone fractures

Introduction

The bone consolidation is one of the big concerns in medicine, mainly with people of advanced age, with some pathology, as being metabolic or vascular types among other causes of the retard of bone healing. In some cases it is possible to think in a treatment that allows to accelerate the osteogenesis, nonetheless, there are few non intrusive methods available (laser, magnetic and electric fields etc.) and in many cases are natures (there is not an external treatment).

For the case of natural bone consolidation the integration of bone with tissue and corporal liquids create a bone callus, as time pass, modifying all their chemical, physical and biological properties of the tissue-bone system in the fracture. An alternative way to know the changes during bone consolidation could be done by photoacoustic (PA) analysis of fracture bone callus, at different times of bone consolidation, where it would be possible to obtain the optical absorption spectra at different consolidation stages. Through our PA analysis it was possible to verify the presence of alkaline phosphatase, the main substance which cause the bone consolidation.

The alkaline phosphatase (AP) is an enzymatic set, mainly founded in the liver (ALP-1 isoenzyme) and bone (ALP-2 isoenzyme). There are also small quantities produced by intestine (ALP-3 isoenzyme), placenta and kidney. The level of phosphatase in blood gives a

measurement of the released phosphatase from the mentioned tissues above. As its name indicates, this enzyme is associated with an alkaline pH (approximately 10), and then the enzyme itself is inactive in blood. The AP acts for defold of phosphorous, creating an alkaline pH. The optimum level of AP depends on the age, then an adolescent has a higher level of AP than an adult whose bone growing have finished [1-5], [8].

One important feature of photoacoustic spectroscopy (PAS) technique is that scattered light does not disturb the measurements significantly, so that the optical properties of biological sample can be investigated easily and directly with this technique. The use of PAS to measure optical absorption spectra has advantages over the usual transmission measurements in which the sample needs to be prepared to have a good quality surfaces, and also because with PA measurements we can avoid the optical interference effects to obtain well resolved optical absorption spectra [6]. This study is focusing on natural bone consolidation due to the complex mechanisms that occurs during the consolidation process. In this paper we report the optical absorption spectra of AP at different consolidation periods of fractured rat bones.

Experimental methods

For this study we used twenty Wistar male rats, with 350 gr average weight. The care and feeding were done in agreement with Mexican official standard NOM(Z0066-98). A pentobarbital sodic dose (50 mg/Kg) was intraperitonally applied, 5 mm below of apofisis xifoide. It was perfomed a 3 to 5 mm incision in medial craneum, in the tibia distal third. It was separated the superficial and deep faces with Zen Miller separators. After this it was used a jeweller fretsaw to make the fracture outline, taking care of don't damage other tissues. To stabilize the fracture it was placed a Kirschner wire (0.035 mm stainless steel wire). The final stage in this process was to stitch layer by layer, beginning by periostis, muscle and finally the skin. Later it was cleaned the injury with a saline solution and the rats were placed in polycarbonate cages, with steel lid and it was allowed them free movement. Two rats were sacrificed each six days and "antero posterior" radiographies were taken of them. In our study we take into account only the right tibias of the sacrificed rats also the soft tissues were removed, after this the tibias were dried in a natural way. From the fracture bones a fragment of the formed callus was removed (approximately 15 mm² area) by using a fretsaw.

The optical absorption spectra of the removed fracture bones, were obtained in the range of 350 to 850 nm by using a home-made PA spectrometer as showed in Fig. 1. The experimental setup consisted of a 1000 W Xenon lamp (Oriel), a variable frequency mechanical chopper, set at 17 Hz, a monochromator, and an air-filled brass cell with a condenser microphone. The PA signal from the microphone provided the input to the signal channel lock-in amplifier (SR-850) which is interfaced to a personal computer, displaying the wavelength-dependent signal amplitude and phase simultaneously. In order to take into account the Xe lamp emission spectrum, the PA signal was normalized to the signal obtained from charcoal powder.

Results and discussions

Figure 2, shows the PA optical absorption spectra of dry fractured bones of the Wister male rat. These spectra, in the range of 350 to 850 nm, correspond to bones with blood and bone callus.

For these experiments twenty rats were sacrificed at different bone consolidation times (from 6 to 50 days). It was observed that PA optical absorption spectra decrease in amplitudes as the consolidation time increases. The characteristic absorption peaks of hemoglobin (430 and 530 nm) are observed [9,10]. In this figure the spectrum corresponding to normal bone, without bone callus but with blood, is denoted by a solid line. The PA differential spectra between the optical absorption spectra of bones (at different consolidation times as they are shown in Fig. 2) and the spectrum

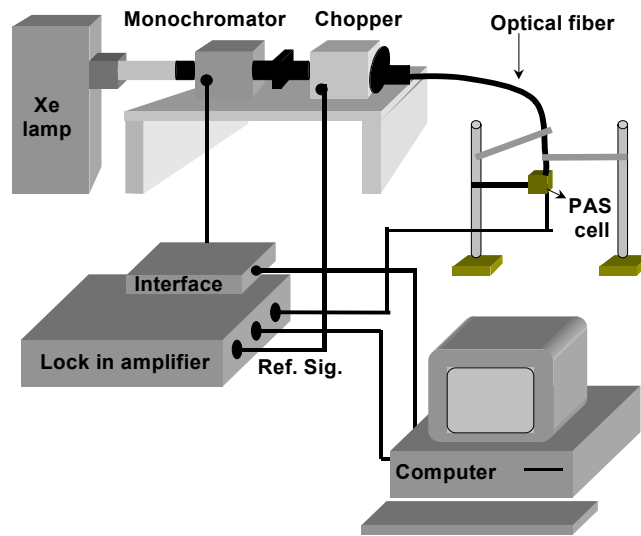


Fig. 1. Experimental set-up used in Photoacoustic spectroscopy.

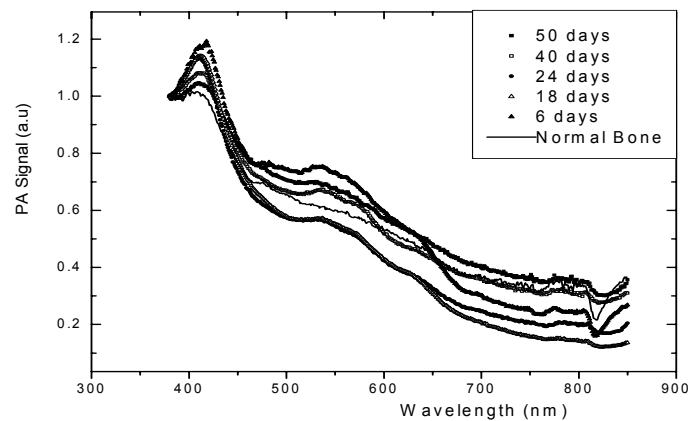
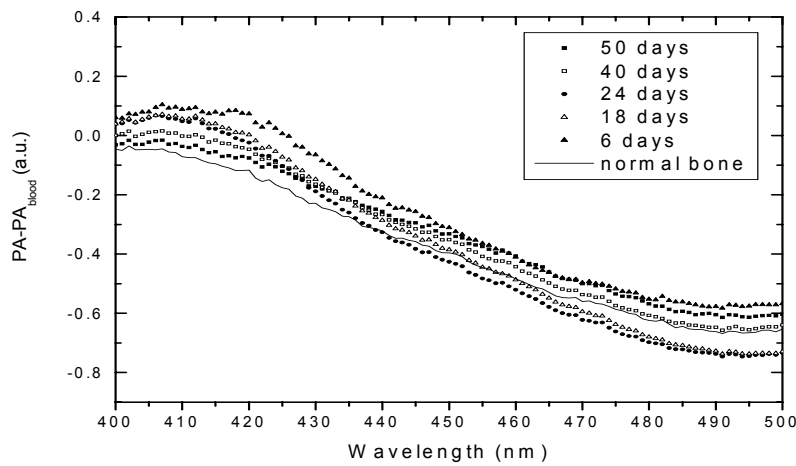


Fig. 2. Photoacoustic absorption spectra of dry bones with bone blood and callus at different consolidation times. In these spectra it is possible to see the characteristic absorption peaks of hemoglobin at 430 and 530 nm.

corresponding to normal bone with blood was done. To this PA differential spectra were subtracted the PA spectrum obtained from blood in order to have a callus spectra which is showed in Fig.3. In these PA callus spectra it is possible to see a maximum absorption band in the range of 404 to 412 nm, which corresponds to absorption range of p-Nitrophenylphosphatase which presence is characteristic in rat fractured bones [7]. In this figure it is possible to observe the same behaviour as in Fig. 2 but without the presence of blood. Here the absorption band corresponding to this alkaline phosphatase decrease as the callus grows in the consolidation time. In Fig. 4 we show the PA average values, corresponding in Fig. 3 to the PA values in the range of 404 to 412 nm, presented as a function of consolidation time (0 to 50 day after fractured). Each point in this figure corresponds to three samples. As it can be seen these values decrease as a function of time in a three-cornered way. This behaviour indicates that alkaline phosphatase concentration decrease as the bone is



consolidating (and the bone callus is growing). These results are in agreement with the evolution of serum alkaline phosphatase activities reported for patients with fractures [7].

Fig. 3. Differential Photoacoustic absorption spectra of bone callus at different consolidation times. In these spectra it is possible to see a maximum absorption band in the range of 404-412 nm, which corresponds to absorption range of p-Nitrophenylphosphatase. This phosphatase is characteristic in fractured rat bones [7].

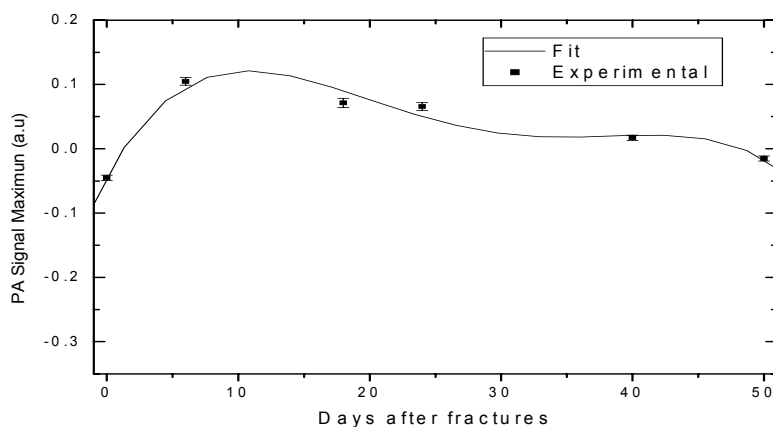


Fig. 4. We show the average values of PA signal at 404-412 nm bands (as presented in Fig.3) as a function of the consolidation time.

Summary

It was performed a study about consolidation of fractured tibia bones of Wister rats. By obtaining PA optical absorption spectra of these fractured bones, in which a bone callus is formed, it was possible to verify the presence, between other components, of alkaline phosphatase at different concentrations, by identifying its characteristic optical absorption band as a function of at different bone consolidation times.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the technical support of Ing. M. Guerrero, one of the authors (J.L. Jiménez Pérez) wants to thank the partial financial support received from Conacyt - México, CGPI and COFAA – IPN México.

References

- [1] T. Diamond, M. Lindenberg, *Aust. Fam. Physician* Vol.31(8) (2002), p. 751
- [2] A.K. Vocke-Hell, A. Schmid, *J. Pediatr. Orthop. B*, Vol. 10(2) (2001) p.138.
- [3] C. Simonelli, *J. Am. Med. Womens Assoc.* Vol. 55(4) (2000), p. 228.
- [4] K.H. Cho, B.H. Park, K.M., Yeon, *Ultrasound CTMR* Vol. 21(3) (2000), p. 214
- [5] M. Bohnsack, F. Gosse., O. Ruhmann, K. Wenger, *J. Spinal Disord.* Vol. 21(6) (1999), p. 481
- [6] A. Rosencwaig, A. Gersho, *J. Appl. Phys* Vol. 47 (1976), p. 64
- [7] R. B. McComb, G. N. Bower, Jr. and S. Posen, *Alkaline Phosphatase* (Plenum Press. New York and London. 1979).
- [8] *Laser Therapy* Vol. 6 (1994), p. 16
- [9] I.G.F. Freitas, V. Baranauskas, M.A. Cruz-Hofling, *Appl. Surf. Sci.* Vol. 154-155 (2000), p. 548
- [9] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler, *Biophysics* (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1983).
- [10] A. Rosencwaig, *Science* Vol. 18 (1973), p. 657