

Aplicación de celda fotoacústica diferencial en la determinación de la permeabilidad de agua en hueso descalcificado

Application of differential photoacoustic cell to determine water permeability in decalcified bone

María de Lourdes Cortés-Ibarra¹, Guillermo M. Urriolagoitia-Calderón², Luis Héctor Hernández-Gómez³, María Luisa Mendoza-López⁴, Mario Enrique Rodríguez-García⁵, Guillermo Urriolagoitia Sosa⁶

Resumen

La espectroscopia mediante celda fotoacústica diferencial (CFD) tiene la capacidad de medir *in situ* el desarrollo de diversos procesos dinámicos, entre otros la difusión de agua a través de una membrana. Mediante esta técnica se realizó el estudio de permeación de agua en huesos de rata Wistar sanos y descalcificados. Los huesos descalcificados fueron tratados mediante estimulación electromagnética a fin de evaluar la actividad celular en el hueso y, en su caso, detener la descalcificación del mismo. En este trabajo fue posible determinar la viabilidad de la CFD para la evaluación de densidad ósea indirectamente, siendo posible efectuar la evaluación *in situ* de permeación de agua, así como la cantidad de agua retenida en la estructura ósea al finalizar las pruebas en CFD.

Palabras clave: electromagnetismo, estimulación, huesos, osteoporosis.

Abstract

Differential photoacoustic cell (DPC) spectroscopy is able to measure the development of several dynamic processes *in situ*, such as water diffusion through a membrane. This technique was used for studying water permeation in healthy and decalcified Wistar rat bones. Decalcified bones were given electromagnetic stimulation to evaluate

-
- 1 Dra. en Ingeniería Mecánica, Departamento de Bioelectrónica, de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, IPN, Av. Acueducto s/n col. Barrio la laguna Ticoman, Gustavo A. Madero, c.p. 07340, México, D.F. mcortesi@ipn.mx
 - 2 Dr. Ingeniería Mecánica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, ESIME-IPN, Unidad Adolfo López Mateos (Zacatenco), Edificio 5, 2do. Piso, col. Lindavista, c.p. 07738, México, D.F. urrio332@hotmail.com
 - 3 Dr. Ingeniería Mecánica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, ESIME-IPN, Unidad Adolfo López Mateos (Zacatenco), Edificio 5, 2do. Piso, col. Lindavista, c.p. 07738, México, D.F. luishector56@hotmail.com
 - 4 Dra. en ciencias Centro de Física aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Carretera Querétaro-San Luis Potosí Km. 15, C.P. 76230, Querétaro, México. mluisaml@yahoo.com
 - 5 Dr. en ciencias Centro de Física aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Carretera Querétaro-San Luis Potosí Km. 15, C.P. 76230, Querétaro, México. mluisaml@yahoo.com
 - 6 Dr. Ingeniería Mecánica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, ESIME-IPN, Av. De las Granjas 682 col. Sta. Catarina, Atzacapotzalco, c.p. 02550, México, D.F. guiurri@hotmail.com

cell activity in bone and attempt to detain decalcification. It was possible to determine the viability of applying DPC for indirectly evaluating bone density in situ, as well as the amount of water retained within bone structure.

Key words: electromagnetism, stimulation, bones, osteoporosis

Recibido: noviembre 19 de 2007

Aprobado: noviembre 24 de 2008

Introducción

En los últimos años, la Espectroscopia Fotoacústica (PAS) ha despertado un enorme interés debido a su aplicación en diversos campos. Esta técnica espectroscópica es complementaria a las técnicas usuales, Absorción, Emisión, Fluorescencia, etc., las cuales utilizan los procesos de relajación radiactivos, mientras que la espectroscopía PAS utiliza los procesos de relajación no radiactivos, estos originan la conversión de parte de la energía absorbida en energía térmica, lo cual da lugar a variaciones de presión que pueden ser detectadas como señales acústicas mediante un transductor.

El efecto fotoacústico, en general, se refiere a la transformación de energía electromagnética en energía acústica. Fue descubierto por Alexander Graham Bell en 1880, sin embargo por un largo periodo de tiempo fue olvidado debido a la falta de sensibilidad en aplicaciones espectroscópicas. La técnica fotoacústica ha sido utilizada para determinar propiedades de semiconductores (Pinto et ál., 1989) de metales (Vázquez et ál., 2000, Charpentier et ál., 1982), de polímeros (Balderas y Mandelis, 2001) de biopolímeros (Yáñez et ál., 1995). Las aplicaciones en materiales orgánicos han incluido el estudio de huesos de res, así como membranas de maíz (Hurtado et ál., 2005, Peña et ál., 2000). Actualmente, en los sistemas existentes se tiene la adquisición de datos para la muestra y la referencia en diferentes tiempos, lo cual implica que no se contemplan las mismas condiciones de operación y sus efectos externos al momento de realizar el análisis de resultados. Es por ello que se propone la aplicación de una celda fotoacústica diferencial (CFD) en donde

el resultado obtenido es la diferencia entre los datos de la muestra y la referencia, eliminando así efectos tales como: variación de temperatura, ruidos externos y ruido electrónico.

La osteoporosis es una condición caracterizada por pérdida progresiva de la densidad de masa ósea, aumento en la porosidad, adelgazamiento del tejido óseo y mayor vulnerabilidad a las fracturas. Esta condición es consecuencia de una enfermedad que origina cambios en el metabolismo y la producción de iones de calcio (Mansur et ál., 2004), así como deficiencia dietética u hormonal o bien como consecuencia de edad avanzada (Serrano et ál., 2001).

La osteoporosis es una enfermedad en la cual disminuye la densidad de los huesos dando como resultado un esqueleto débil y un incremento en el riesgo de fractura, especialmente en aquellos elementos que están expuestos a posibles sobrecargas, tales como columna vertebral, muñeca, cadera, pelvis y brazo. La osteoporosis y las fracturas que se ocasionan como consecuencia, son una importante causa de morbi-mortalidad. En muchas de las personas afectadas la pérdida de hueso es gradual y no presenta síntomas hasta que la enfermedad se encuentra en etapas avanzadas. Esta enfermedad también se conoce como “el ladrón silencioso”, porque las personas que la padecen generalmente no saben que la tienen hasta que ya es demasiado tarde. Desafortunadamente, en muchos de los casos, el primer “síntoma” es un hueso roto. Otro síntoma también puede ser, la pérdida de estatura, con la presencia gradual de una joroba (causada por compresión vertebral), estos pueden ser los únicos aspectos

físicos notables de la osteoporosis (Montes et ál., 2000).

En este trabajo se plantea determinar la cantidad de agua permeada en huesos de ratas Wistar sanas y descalcificadas, estas últimas fueron ovariectomizadas (OVX), con lo que se provoca menopausia temprana resultando en pérdida de masa ósea, y por ende descalcificación. Posterior a la descalcificación se aplica una técnica no invasiva, basada en campos magnéticos de baja frecuencia, con esto se logra evitar la progresión de pérdida de masa ósea (Cano et ál., 2002), lo que da como resultado disminución de osteoporosis.

Materiales y equipo

- Celda fotoacústica diferencial (CFD) -diseñada en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, que consiste de dos celdas de 58 mm de diámetro y 54 mm de profundidad, selladas herméticamente, se encuentran conectadas a un reservorio común, el cual contiene agua desionizada que interactúa con la muestra y con la referencia al mismo tiempo. En la figura 1 se observa el arreglo experimental que cuenta con un láser verde de longitud de onda de 532 nm y potencia de 160 mw para generar

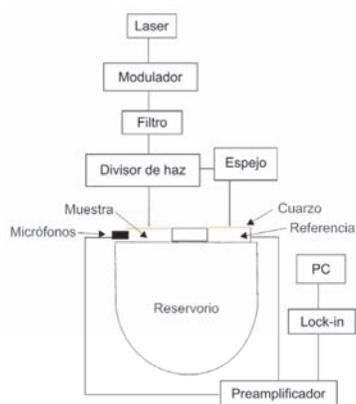


Figura 1. Arreglo experimental de la celda fotoacústica diferencial

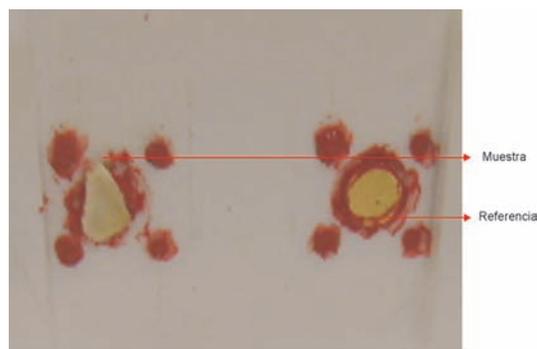
microcalentamiento en la muestra y, posteriormente, del aire contenido en la celda, lo que posibilita leer cambios de presión y transformarlos en sonido, el cual se detecta mediante un micrófono electret que envía la señal a un amplificador (100x) SR830, el que a través de una interfase de propósito general efectúa el procesamiento digital de la señal.

Esta CFD emplea espejos de alto índice de reflectividad y un divisor de haz (60/40) para separar el láser incidente en dos líneas con incidencia perpendicular a la muestra colocada dentro de cada celda.

- Reservorio para agua desionizada, contenedor de muestra de tejido óseo y muestra de referencia (figura 2a).
- Muestras de hueso sano de ratas de cepa wistar.



a) Celda fotoacústica diferencial



b) Elementos utilizados en el análisis

Figura 2. a) Celda fotoacústica diferencial, donde se observa el reservorio, b) Muestra de hueso y placa de oro utilizada como referencia

- Muestras de hueso descalcificado de ratas de cepa wistar, las cuales se ovariectomizan para provocar menopausia temprana y lograr descalcificación.
- Las muestras son huesos ileón, recolectadas de ratas Wistar de 20 semanas de edad, con longitud de 0,988 a 1,15 cm.
- Placa de oro utilizada como referencia de 280 ± 5 micrómetros de espesor (75% en peso de oro).
- Equipo de cirugía para la disección y obtención de las caderas.
- Equipo electromagnético de diseño propio, que consta de una unidad controladora y dos bobinas Helmholtz, mediante el cual la forma de onda aplicada es creada por un generador de señal que en la etapa de potencia aplica una señal de campo electromagnético de un Gauss, con pulsos de 700 ms sobre el espécimen que es colocado de forma perpendicular al campo inducido (figura 3).

Metodología

Se estudiaron 7 grupos de 3 ratas cada uno, de 20 semanas de edad y 300 ± 20 g de peso medio, alimentadas con balanceado acor-

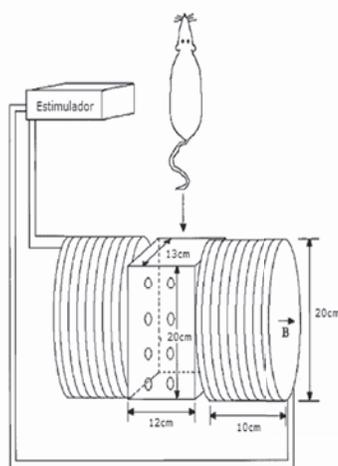


Figura 3. Sistema de estimulación de campo electromagnético pulsado (PEMF) para la rata (vista superior).

de con la especie. Cada grupo se constituyó a su vez de 3 muestras de tratamiento, testigo (TEST), ovariectomizada (OVX), ovariectomizada y radiada (OVX+rad). En los 7 grupos se realizaron estancias individuales y se alimentaron con agua y pellets marca purina 5008 a libre demanda. El cuidado, la alimentación y el uso de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la norma oficial NOM-062-ZOO-1999.

Para aplicar la radiación electromagnética a los grupos experimentales se situó el campo electromagnético en forma tal que dicho campo quedara perpendicular al cuerpo de la rata, con objeto de asegurar que el flujo electromagnético fuese adecuado para estimular las células óseas promotoras de la descalcificación y por ende del cambio de la masa ósea. Como se mencionó la magnitud del campo es de un Gauss con pulsos de 700 ms, lo que se aplica durante 4 semanas, por periodos de 4 horas diarias con la finalidad de evitar la progresión de resorción ósea (Cano et ál., 2002).

Posterior al tratamiento se realiza el sacrificio y la disección de las ratas para obtener las caderas, las cuales proporcionan un área suficiente para cubrir la celda fotoacústica. El hueso se colocó en solución fisiológica hasta el desprendimiento total del músculo y los ligamentos; a continuación, para fabricar la probeta de prueba ajustada al tamaño de la celda, el hueso se limpia y se corta. Para su análisis, se deja secar durante 3 semanas almacenándolo en presencia de sílica gel para evitar la absorción de humedad. En la figura 4 se ve la muestra de una cadera limpia en la que se ha marcado el área de interés para el estudio.

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron las pruebas en el equipo CFD descrito anteriormente (figuras 1 y 2a) con el cual se observó el comportamiento de dos variables, la amplitud dependiente de la frecuencia, y la variación de amplitud y fase con respecto al tiempo, bajo el fenómeno perturbador de interés descrito en Lomeli et ál., (2002). En este trabajo se emplea la CFD y un láser con una longitud de onda de 532 nm y una potencia de

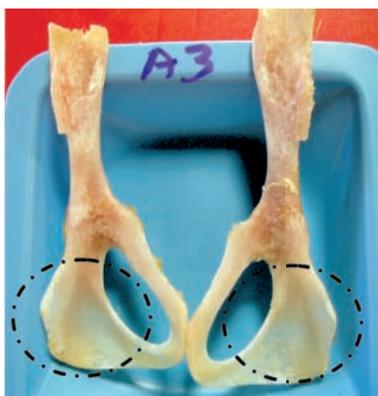


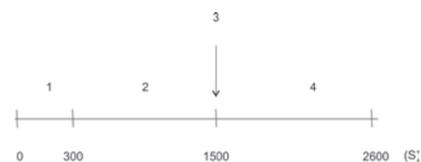
Figura 4. Muestras de cadera obtenida para el análisis en CFD. El círculo indica el área empleada en dicho estudio.

160 mW, con el cual se generan microcalentamientos tanto de la muestra como del aire contenido dentro de la celda fotoacústica; debido a la variación de presión en la cámara los cambios obtenidos son transformados en sonido, el cual es detectado por un micrófono electret, que a su vez envía la señal al amplificador de amplitud y fase SR830; estas señales amplificadas se reciben en una interfase de propósito general (GPIB) la cual efectúa el procesamiento digital de la señal (Rodríguez-García et ál. 2007).

Las muestras óseas fueron colocadas en la celda fotoacústica, sellando herméticamente dicha celda mediante silicón en frío. Como celda de referencia se empleó un sustrato de oro (99,9% pureza) con un espesor de 278 micrómetros (figura 2b).

Cabe mencionar que la muestra está conformada por hueso denso y hueso poroso, por lo cual la interacción del agua será para ambos tipos de hueso. El láser, con potencia dividida (60/40), provoca pequeños calentamientos periódicos, lo cual promueve que el aire encerrado en la celda se expanda y contraiga como respuesta al intercambio de calor con la muestra. Las variaciones de la presión del aire son proporcionales a los cambios generados en el material.

Para llevar a cabo la experimentación se consideró efectuar un barrido de frecuencias a fin de determinar la frecuencia específica a la cual la muestra es sensible y viable para evaluar los procesos dinámicos. En la figura 5 se observan los periodos de tiempo considerados: 300 segundos para estabilización, 1200 segundos para permeación, en el punto 3 retiro súbito de agua para finalmente pasar al periodo de microcalentamiento hasta secado. Para realizar una prueba satisfactoria las muestras se cubrieron totalmente con agua desionizada, lo que evitó el intercambio de iones. Se dejó transcurrir un tiempo de 20 minutos para que la muestra absorbiera toda el agua posible. Una vez que la muestra absorbió el agua, se procedió a reducir súbitamente el nivel de agua manteniendo el microcalentamiento con el láser, logrando medir el tiempo (2600 s) en el que se detecta la pérdida de agua en hueso debido a secado.



1. Estabilización
2. Periodo de absorción de agua desionizada
3. Reducción súbita de agua
4. Continuación de microcalentamiento

Figura 5. Tiempo utilizado para la estabilización, absorción y secado de las muestras.

Discusión de resultados

Las señales de amplitud versus frecuencia, que se observan en la figura 6, presentan un comportamiento específico en donde se nota que la muestra de hueso sano tiene pequeños picos sobre el eje de frecuencia, estos picos muestran el incremento de la intensidad de amplitud; ahora bien, debido a que estos picos corresponden a múltiplos de 60 Hz, se considera que se deben a ruido electrónico introducido por la toma de corriente; el siguiente paso consistió en evaluar el comportamiento de la muestra de hueso sano a la frecuencia en

la cual el oro muestra un comportamiento estable, se concluye que una frecuencia de 78 Hz es la adecuada para los estudios de permeación de agua. En la figura 7a se observa el diagrama de amplitud versus tiempo para un hueso de rata hembra sana. Inicialmente, durante el periodo de estabilización (300 s), la señal de amplitud se mantiene constante, en el momento en que el hueso es cubierto por agua desionizada se tiene un ligero incremento de la amplitud de la señal debido a la interacción del agua con el hueso compacto (cortical) de la cadera. La permeación de agua en hueso cortical, de acuerdo con la amplitud, es baja debido a la estructura y densidad que posee. Esto se debe a la capacidad de la estructura para permitir el flujo de calor y a que el material no tiene espacios vacíos que puedan ser llenados con agua. El hueso interno de la cadera presenta una estructura diferente al hueso cortical, por lo cual se requiere de mayor tiempo para que el agua lo permee antes de interactuar con la estructura del hueso trabecular.

Una vez que el agua traspasa el hueso cortical, se tiene una permeabilidad mayor al incremento de porosidad, lo que permite que mayor cantidad de agua llene los espacios libres de minerales. Lo anterior se observa por el incremento súbito de la intensidad de la amplitud a aproximadamente 1500 s. Posteriormente, se observan variaciones pequeñas de esta amplitud, cuando la muestra interactúa con el agua, lo cual se atribuye a ésta comienza a interactuar ahora con el hueso trabecular que está en contacto con el láser pero sin afectar notoriamente las estructura de la muestra y, por tanto, las propiedades térmicas del material. En la tercera etapa después de 3000s se observa que la amplitud tiende a decrecer de manera paulatina. Dicho comportamiento se debe a que el agua ha sido retirada de la muestra de la parte del hueso cortical, sin embargo internamente en el hueso trabecular todavía mantiene el agua que permearon las diferentes estructuras de la muestra. El calentamiento modulado continúa y propicia que parte del agua en el

interior del hueso se separe de la muestra, modificando de esta manera la estructura y por tanto la señal de amplitud, así como las propiedades térmicas.

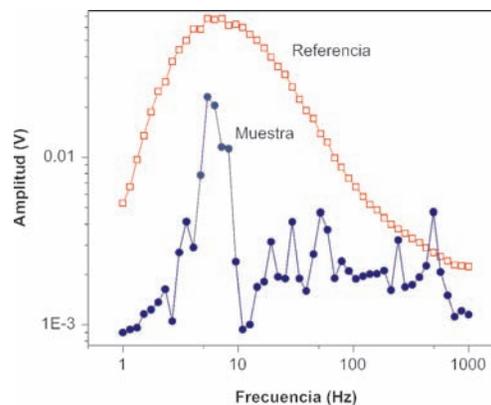


Figura 6. Diagrama de amplitud versus la frecuencia típica para la referencia (oro) y la muestra (hueso sano).

El ajuste de las propiedades térmicas presenta tres aspectos principales que son: variaciones en la estructura, espesor y curvatura de la muestra. La señal de referencia no presenta ningún cambio que se pudiese atribuir a ruido, por lo cual se juzga que la medición es realizada de forma adecuada y se puede concluir que los cambios son debidos al proceso dinámico en evaluación.

Así, dado que la rata no sufre ningún tipo de enfermedad que pudiera provocar variaciones estructurales óseas, se considera que el único cambio posible se da en la distribución del tejido óseo, con una estructura densa y porosa en el interior de la muestra.

En la figura 7b se presenta el comportamiento de la fase con respecto al tiempo para el hueso sano. Se observa que el agua, en el inicio de la segunda etapa, promueve un desfaseamiento en la referencia pero en la muestra la variación es casi imperceptible. El desfaseamiento de la señal que se presenta a aproximadamente 1400 s, es de alrededor de 85°, lo cual se relaciona con el cambio de estructuras que permiten liberación de energía, lo que propicia

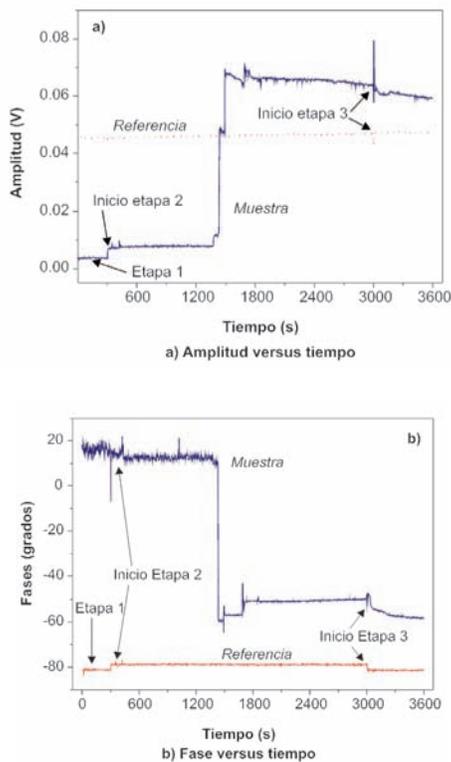


Figura 7. Diagramas obtenidos para un hueso de hembra sana. a) Amplitud versus tiempo y b) fase versus tiempo mostrando el comportamiento in situ de la permeación de agua en el hueso.

que el aire en la celda varíe su presión en forma diferente a las ondas previas. La difusión de agua desionizada hacia el interior de la muestra reduce el desfase debido a que el agua es un material que llena poco a poco los espacios en el hueso, pero como la porosidad no es muy elevada en el hueso sano, la cantidad de agua que puede difundirse es relativamente pequeña. El retiro de agua de la muestra promueve una variación de la fase, debido a la pérdida de agua y liberación de los espacios huecos en ésta. El uso de la referencia permitió identificar los tiempos de aplicación y remoción de agua sobre la muestra.

La figura 8a muestra la amplitud versus tiempo para una muestra descalcificada. Se observa que la respuesta de interacción del agua con la muestra es inmediata, por lo cual se tiene una rápida modificación de la estruc-

tura ya que el agua llena rápidamente los espacios vacíos. Durante la interacción del agua con la muestra se observan pequeños cambios en amplitud pero se mantiene una línea base estable. Este comportamiento sugiere que aun existen pequeñas cantidades de agua dentro del material, la que debido a los microcalentamientos proporcionados por el láser, fuerza la salida de la misma modificando continuamente la respuesta de la estructura del hueso. Para este caso, en el inicio de la etapa 3, cuando se retira súbitamente el agua, se observa un incremento de la amplitud, en este punto ya no se tiene un movimiento continuo de entrada de agua. El agua modifica la estructura del material debido a que al ser retenida en el hueso y unirse a éste, lo hidrata y, por tanto se modifica también su difusividad térmica; este tipo de interacción agua-hueso origina que se requiera una mayor cantidad de energía calorífica para la remoción del agua, en comparación con el caso del hueso sano. Los datos de la referencia al mantenerse, nos permiten

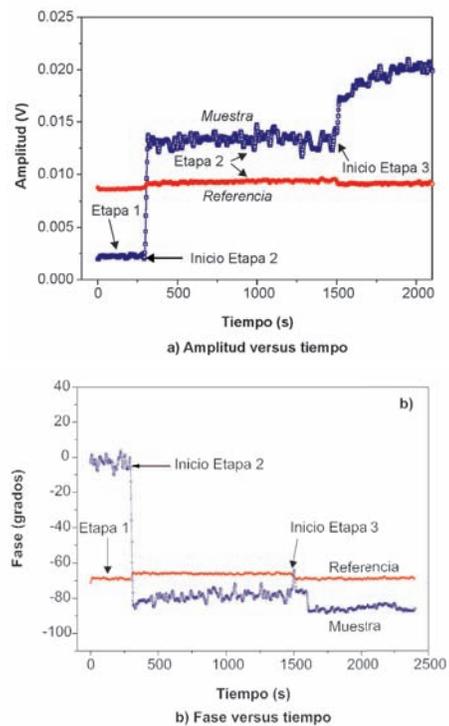


Figura 8. Diagramas para un hueso con descalcificación. a) Amplitud versus tiempo y b) Fase versus tiempo.

concluir que, como en el caso anterior la medición refleja los cambios del proceso dinámico en estudio.

La figura 8b muestra que la interacción de agua con el hueso modifica la estructura y desfasa la onda de sonido. En el periodo de contacto de agua con la muestra varía la amplitud pero se mantiene una línea base, por lo cual se considera que el desfaseamiento neto es mínimo. El retiro súbito de agua se detecta por el cambio súbito de fase, pero ahora en el secado no se genera una curva característica de eliminación de agua al mantener prácticamente constante la fase. Debido a esto se puede inducir que la estructura cambia de manera gradual y de una forma casi imperceptible para la fase.

En la figura 9a se observa que la interacción del agua con el hueso es inmediata, propiciando una variación en la amplitud y disminuyendo su intensidad. De esto se infiere que el agua se difunde rápidamente en los poros de la muestra. En el periodo de contacto de la muestra con el agua, etapa 2, se tienen pequeñas fluctuaciones pero se observa que la referencia también tiene un comportamiento similar, por lo cual se puede atribuir este comportamiento a una causa ajena al proceso dinámico en evaluación. Con esto como base se considera que la disminución de la amplitud se debe al llenado con agua de los poros en el material, pero que este cambio estructural no presenta cambios continuos de entrada y salida de agua, por tanto, las cavidades solo absorben la suficiente cantidad de agua para llenarlos. Cuando se retira el agua de la superficie de la muestra se observa un secado paulatino, constante y sin que se generen cambios estructurales que modifiquen difusión y difusividad.

La figura 9b muestra fases muy estables y que se relacionan más con la interacción de agua-oro (el oro no se moja) y agua-hueso (se absorbe). No se observan cambios de fase que puedan ser atribuidos a cambios estructurales.

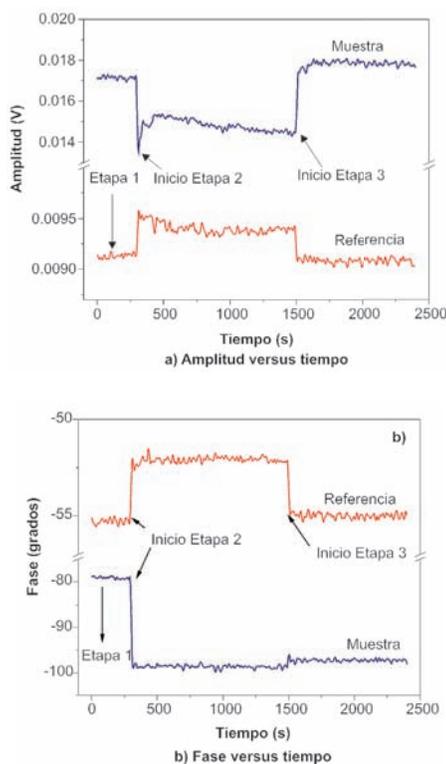


Figura 9. Diagramas para un hueso con descalcificación + ovx. a) Amplitud versus tiempo y b) Fase versus tiempo.

Conclusiones

Mediante la técnica fotoacústica diferencial fue posible observar *in situ* las variaciones estructurales en el hueso debidas a la interacción de agua con las cavidades en la muestra.

En el caso de huesos descalcificados, el agua llena los huecos y cambia la difusividad térmica del material, lo cual se puede observar en las gráficas presentadas.

No fue posible realizar una aproximación matemática de las propiedades térmicas debido a la irregularidad de forma y estructura de la muestra, sin embargo esto se tiene planteado como trabajo futuro.

La aplicación de campos magnéticos promueve cambios estructurales en el hueso. La estructura no presenta, de acuerdo con la evaluación en CFD, variaciones importantes en la generación de la señal fotoacústica. Este

comportamiento indica que la interacción agua-hueso se mantiene estable. Solamente se observa el incremento de intensidad en la amplitud debido a que se modifican los medios en contacto de aire a agua.

Los resultados muestran que es posible realizar un seguimiento del proceso de permeabilidad (difusión) de agua hacia el interior de las muestras óseas. Las variaciones estructurales debidas a la formación de poros de mayor tamaño y al número en las muestras de ratas descalcificadas fueron perceptibles en la CFD.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo para la realización de las pruebas al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla y al CONACYT.

Referencias bibliográficas

- Balderas-López, J. A.; Mandelis, J. 2001. Thermal Diffusivity measurements in the Photoacoustic Open-Cell Configuration using Simple Signal Normalization, *Techniques Appl Phys* 90 (5), 2273-2279.
- Charpentier, P.; Lepoutre, F. 1982. Photoacoustic measurements of thermal diffusivity description of the 'drum effect', *J. Appl Phys* 53, 608.
- Cano-Sánchez, M.A.; Díez-García, M.P.; León-Hernández, S. R. 2002. Tratamiento de las fracturas no-uniión y en el retardo de la consolidación con aplicación de la magnetoterapia. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación* 14. 26-30.
- Fernandez-Seara, M. A.; Wehrli, S. L.; Wehrli, F. W. 2002. Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance. *Biophysical Journal* 82 522-529.
- Hurtado-Castañeda, D. M.; Fernández, J.; Gutiérrez, E.; Rojas-Molina, I.; Fernández-Muñoz, J. L.; Rodríguez, M. E.; 2005. The diffusion of calcium ion into the organic layers studied by a differential photoacoustic system. *J Phys IV France* 12. 833-836.
- Lomeli, P. A.; Urriolagoitia, G. 2002. Aceleración del Proceso de la consolidación ósea empleando Láser. *Memorias III Congreso Internacional de Ingeniería Electromecánica y de Sistemas. Memoria Ing. Mecánica.*
- Mansur, R.; Jadwiga, B. 2004. Changes of the calcium metabolism in mineralized tissues of rats during experimental postmenopausal osteoporosis. *Bull Vet Inst Pulawy* 48, 467-470.
- Montes-Castillo, M. L.; Pérez Benítez, M. L. I.; Díaz-Barriga, A. S.; Vázquez Jasso, A. J. 2000. El balance y las caídas en la tercera edad: consecuencias, evaluación y tratamiento. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación* 12. 16-20.
- Ong, H. H.; Wright, A. C.; Wehrli, S. L.; Song, H. K.; Wehrli, F. W. 2005. Measurement of water apparent diffusion coefficient in rabbit cortical bone with pulsed gradient NMR. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 13, 8.
- Peña Rodríguez, G.; Méndez González, M.; Calderón Arenas, A.; Cruz Orea, A.; Sánchez Sinencio, F. 2000. Caracterización térmica de hueso y substratos metálicos para uso biomédico. *Biomecánica* 8 (1), 40-43.
- Pinto, A.; Vargas, H.; Leite, N. F.; Miranda, L. C. 1989. Photoacoustic investigation of semiconductors: Influence of carrier diffusion in PbTe and Si. *Phys Rev B* 40, 3924.
- Rodríguez-García, M. E.; Velásquez-Hernández, R.; Mendoza López, M. L. 2007. Differential photoacoustic cell for electrochemical and dynamic process with temperature control. *Review of Scientific Instruments* 78, 034904.