

Trabajo Fin de Grado
Ingeniería de Electrónica, Robótica y
Mecatrónica.

Diseño y validación de utillaje para la
caracterización mecánica de tejidos óseos por flexión
en 3 puntos

Autor: Helena Moriana Membiela

Tutor: Esther Reina Romo

Pablo Blázquez Carmona

Dpto. Ingeniería Mecánica y Fabricación
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2023



Trabajo Fin de Grado
Ingeniería Electrónica, Robótica y Macatrónica

**Diseño y validación de utillaje para la
caracterización mecánica de tejidos óseos por
flexión en 3 puntos**

Autor:

Helena Moriana Membiela

Tutor:

Esther Reina Romo

Catedrática de Universidad

Pablo Blázquez Carmona

Dpto. Ingeniería Mecánica y Fabricación

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2023

Trabajo Fin de Grado: Diseño y validación de utillaje para la caracterización mecánica de tejidos óseos por flexión en 3 puntos

Autor: Helena Moriana Membiela

Tutor: Esther Reina Romo
Pablo Blázquez Carmona

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2023

El Secretario del Tribunal

A mi familia

A Dani y a mis amigos

Agradecimientos

Me gustaría dedicarles unas palabras de agradecimiento a mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional en toda esta etapa, sus ánimos y consejos. También me gustaría agradecer a todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de estos años, haciendo la estancia en la escuela mucho más fácil y llevadera. Gracias a Dani por siempre animarme a dar lo mejor de mí y ser un apoyo incondicional en los momentos más difíciles. Sin vosotros nada de esto habría sido posible.

También me gustaría agradecer a mi tutora Esther Reina por brindarme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la biomecánica y permitirme trabajar con ella. No quiero olvidarme de Pablo Blázquez y su inestimable ayuda y dedicación. Trabajar con vosotros ha sido un placer.

Helena Moriana Membiela

Sevilla, 2023

Resumen

Los ensayos biomecánicos nos permiten conocer las propiedades mecánicas de organismos biológicos. Uno de los campos de trabajo de esta disciplina es el estudio de las características mecánicas del hueso y su variación ante la exposición a factores como: tratamientos farmacológicos, hábitos de vida, consumo de tóxicos, etc. Para conocer dichas características podemos realizar diferentes ensayos mecánicos, siendo los más comunes los test de tracción, flexión en tres y cuatro puntos, y compresión.

A lo largo de este trabajo se presenta la metodología seguida para diseñar y validar un utillaje que nos permite llevar a cabo ensayos de flexión en 3 puntos en tejidos óseos para modelos óseos de roedores y lagomorfos. Se describen las diferentes fases de diseño por las que han pasado cada una de las piezas que conforman el utillaje y los ensayos realizados para validar el diseño optimizado.

Para esta validación, fueron ensayados un fémur y una tibia de rata Wistar hembra, obteniendo así, sus curvas fuerza-desplazamiento que nos permiten caracterizar dichos segmentos óseos. A partir de estas gráficas se calculan parámetros como: fuerzas de rotura e inflexión, módulo de Young, desplazamiento plástico y energías plástica y elástica. Finalmente, se comparan estos datos con los disponibles en la bibliografía, para valorar la precisión del diseño implementado.

El utillaje diseñado respondió de manera satisfactoria a esta comparación, demostrando su validez para ser utilizado en este tipo de ensayos. Una de las ventajas de mayor interés de este diseño es la versatilidad mostrada, ya que nos permite trabajar con diferentes huesos procedentes de distintas especies.

Abstract

Biomechanical tests allow us to understand the mechanical properties of biological tissues. One field of study within this discipline is the investigation of the specific characteristics of bone and their mechanical changes when exposed to factors such as pharmacological treatments, lifestyle habits, or toxic consumption. In order to determine these properties, different mechanical tests are typically performed, with the most common ones being tensile, three-point and four-point bending, and compression test.

Throughout this study, we present a methodology to design and validate an equipment to perform three-point bending test on rodents and lagomorphs bone models. We discuss the different design phases undergone by each component of the tool and the test conducted to evaluate the usefulness of our design.

To validate the tool, three-point bending tests on a female Wistar rat's femur and tibia were carried out, obtaining force-displacement curves to characterize these bone tissue mechanically. From these data, parameters such as rupture and yield forces, Young's modulus, plastic displacement, and plastic and elastic energies were calculated. Finally, these data were compared with the available literature to assess the quality of the implemented design.

The designed tool responded satisfactorily to this comparison, demonstrating its validity in this type of test. One particularly interesting advantage of this design is its versatility, as it enables us to work with different bones from various species.

Agradecimientos	ix
Resumen	x
Abstract	xii
Índice	xiii
Índice de Tablas	xiv
Índice de Figuras	xvi
1 Introducción	1
1.1 <i>Estado del arte y motivación.</i>	2
1.2 <i>Objetivos.</i>	2
1.3 <i>Estructura del documento.</i>	3
2 Antecedentes	5
2.1 <i>Biomecánica del tejido óseo.</i>	5
2.2 <i>Las patologías del hueso y su influencia en las propiedades mecánicas.</i>	9
2.3 <i>Ensayos mecánicos del tejido óseo.</i>	11
2.4 <i>Diseño del utillaje en distintos modelos óseos.</i>	16
3 Diseño del utillaje para ensayos de flexión en tres puntos	19
3.1 <i>Soporte inferior del utillaje.</i>	20
3.1.1 <i>Estructura general de la pieza.</i>	20
3.1.2 <i>Dimensiones de la pieza.</i>	22
3.2 <i>Apoyos.</i>	25
3.2.1 <i>Estructura general de la pieza.</i>	25
3.2.2 <i>Dimensiones de la pieza.</i>	26
3.3 <i>Pieza para aplicar la carga.</i>	28
3.3.1 <i>Estructura general de la pieza.</i>	28
3.3.2 <i>Dimensiones de la pieza.</i>	29
3.4 <i>Fabricación del utillaje.</i>	30
4 Validación del prototipo	32
5 Conclusiones	38
5.1 <i>Futuras líneas de trabajo.</i>	39
Referencias	41
6 Anexo 1: Planos	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de ratas y ratones como organismos modelo <i>in vivo</i> . [45]	12
Tabla 2. Huesos comúnmente ensayados en test de flexión en tres puntos. Se indica el dato medio de longitud y el tipo de hueso empleado en cada ensayo.	23
Tabla 3. Cantidades y materiales empleados en la fabricación del utillaje.	30
Tabla 4. Parámetros de las curvas fuerza-desplazamiento. Fuerza en el punto de inflexión, F inflex (N); Fuerza en el punto de rotura, F rotura (N); Módulo de Young (N/mm ²); Desplazamiento zona plástica, Desp Plástico (mm); Energía zona elástica, E. elástico (N*m).	34
Tabla 5. Resumen de parámetros obtenidos en varios tipos de hueso de diferentes experimentos usando el método de flexión en tres puntos. Fuerza en el punto de inflexión, F inflex (N); Fuerza en el punto de rotura, F rotura (N); Modulo de Young (N/mm ²); Energía zona elástica, E. elástico (N*mm); Energía zona plástica, E. plástica (N*mm).	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del acoplamiento de la actividad de los osteoclastos (OC) y osteoblastos (OB) [20].	6
Figura 2. El tipo, la función y las fuerzas a las que están sometidos los huesos son muy variables. La longitud y disposición de los huesos también varía en función de la fuerza a la que esten sometidos. Esqueleto humano [27].	7
Figura 3. Zonas del hueso, tipos de tejido óseo (esponjoso y compacto) y detalle de las trabéculas [28].	8
Figura 4. Imágenes de hueso trabecular normales (izquierda) y afectados por osteoporosis (derecha) [21].	9
Figura 5. Clasificación de fracturas según el trazo: (a) Transversal, (b) Oblicua, (c) Espiroidea, (d) En ala de mariposa, (e) Conminuta. [40]	11
Figura 6. Prueba de tensión en un hueso [9].	13
Figura 7. Test de compresión en hueso [47].	13
Figura 8. Test de flexión en 3 y 4 puntos en hueso [19].	14
Figura 9. Esquema de las curvas de Fuerza-Deformación en hueso.	15
Figura 10. Curva fuerza-deformación en 3 tipos diferentes de hueso de rata Wistar [18].	16
Figura 11. Esquema del soporte estándar empleado en ensayos biomecánicos. [52]	17
Figura 12. Soporte final modelado en FreeCAD: (A) Estructura Inferior, (B) Apoyos, (C) Pieza para aplicar la fuerza.	19
Figura 13. Estructura inferior. (1) Corredera superior, (2) Abertura frontal.	20
Figura 14. Zonas de la abertura frontal.	21
Figura 15. Pieza final correspondiente a la estructura inferior. (3) Abertura lateral introducida en el nuevo prototipo.	22
Figura 16. Evolución de la base del utillaje.	22
Figura 17. Largo y ancho del fémur segmentado.	23
Figura 18. Zonas de interés de los apoyos. (1) Agujero pasante, (2) Terminación curva de la zona de apoyo, (3) Guía.	25
Figura 19. Evolución de la pieza de apoyo.	26
Figura 20. Pieza destinada a aplicar la carga. (1) Zona curva en contacto con la muestra, (2) Varilla roscada.	28
Figura 21. Utillaje fabricado.	30
Figura 22. Colocación del fémur para ser ensayado. (A) Validación en el laboratorio, (B) Colocación de la muestra en Prodinger [18].	32
Figura 23. Dirección de aplicación de la carga sobre la sección cortical del fémur [18].	32

Figura 24. Rotura del fémur.

33

Figura 25. Curva fuerza-desplazamiento obtenida para dos muestras de hueso, fémur (azul) y tibia (rojo), de rata Wistar hembra.

33

1 INTRODUCCIÓN

La biomecánica estudia los principios de la aplicación de la mecánica al estudio de las estructuras y fundamentos de sistemas biológicos [1]. Aunque esta definición pudiera llevar consigo el estudio de un gran número de especies, fundamentalmente esta disciplina se centra en el hombre, por lo que se suele definir como una rama de la biofísica que se apoya en conocimientos de mecánica, ingeniería, anatomía y fisiología humana [2]. Se puede definir como *“el conjunto de conocimientos interdisciplinarios generados a partir de utilizar, con el apoyo de otras ciencias biomédicas, los conocimientos de la mecánica y distintas tecnologías en: primero, el estudio del comportamiento de los sistemas biológicos y en particular del cuerpo humano; segundo en resolver los problemas que le provocan las distintas condiciones a las que puede verse sometido”* [3]. El desarrollo de esta ciencia tiene lugar a partir de finales del siglo XIX con la mejora de las prótesis, aunque a lo largo de la historia se ha hecho uso de ella. Leonardo da Vinci es considerado como el primer investigador de esta disciplina [2].

Esta ciencia, por lo tanto, puede trabajar en áreas de conocimiento muy diversas que podríamos agrupar en seis grandes sub-disciplinas [2]:

- Biomecánica médica. Estudia las enfermedades del cuerpo humano relacionadas con el sistema locomotor. Analiza e investiga temas relacionados con lesiones (traumatología), su recuperación mediante ejercicios (rehabilitación), fisiología y ortopedia.
- Biomecánica Fisioterapéutica. Evalúa las disfunciones del sistema muscoesquelético.
- Biomecánica deportiva. Estudia la mejora del rendimiento de los deportistas mediante técnicas de entrenamiento o el diseño de complementos y equipamientos de altas prestaciones.
- Biomecánica ocupacional. Estudia los movimientos y posturas del cuerpo humano en el trabajo, buscando prevenir lesiones y mejorar el rendimiento mediante la identificación y corrección de riesgos ergonómicos en el entorno laboral.
- Biomecánica de los tejidos del cuerpo. Desarrollo de modelos que permitan predecir las deformaciones y tensiones en diferentes tejidos a partir de los esfuerzos a los que está sometido el cuerpo.
- Biomecánica forense. Incluye el estudio de la biomecánica para determinar el modo en el que se han producido las lesiones.

El presente trabajo trata sobre el diseño de un utillaje que puede ser empleado para realizar estudios de biomecánica del tejido óseo. La fase de diseño precisa, en primer lugar, el conocer diferentes aspectos biológicos, fisiológicos y médicos que nos permitan seleccionar el objetivo al que va a ir dirigido nuestro estudio. De esta manera podremos decidir el tipo de muestra que vamos a ensayar y las características que precisa nuestro utillaje. El presente capítulo presentará la motivación de este trabajo y explicará cómo se ha estructurado.

1.1 Estado del arte y motivación.

El tejido óseo es uno de los más abundantes en el organismo. Desempeña funciones fundamentales tales como servir de soporte y protección de partes blandas, sustento del movimiento, reservorio de minerales y almacén interactivo de la médula ósea.

Sin embargo, este tejido también puede sufrir múltiples patologías. Una de las enfermedades más frecuentes es la osteoporosis. Se estima que en España (al igual que en la Unión Europea) la prevalencia de esta enfermedad es del 5.4% de la población, estando presente en el 22.6% de las mujeres y el 6.8% de los hombres mayores de 50 años, lo que sólo en el tratamiento de fracturas supone un 3.8% del presupuesto total en sanidad [5].

También son muy importantes los efectos del cáncer en este tejido. El tumor primario más importante es el osteosarcoma, que afecta aproximadamente a 3 de cada 10.000 personas en España [6]. Pero también tiene interés la metástasis en hueso. De los cánceres que dan lugar a metástasis en hueso destaca el de mama y próstata. El primero es el más frecuente en mujeres con un 12.5% de los diagnósticos a nivel mundial [7]. El segundo, aunque no es el más abundante en hombres, se encuentra entre los más diagnosticados con un 7.8% a nivel mundial [7]. Otro ejemplo de patología ósea es la osteogénesis imperfecta, denominada “la enfermedad de los huesos de cristal”. Se trata de una enfermedad de origen genético y su incidencia es menor que en las enfermedades anteriores, entre 1 cada 10.000 o cada 20.000 nacidos vivos, siendo los casos graves 1 de cada 25.000 personas [8].

Los estudios de propiedades biomecánicas del tejido óseo pueden abarcar campos muy diferentes, pero en todos los casos los datos obtenidos de dichos estudios son considerados muy necesarios para evaluar todo tipo de tratamientos [9,10]. Pueden diferenciarse dos temáticas principales: regeneración ósea y estudios de evaluación de aspectos relacionados con variaciones en la composición del tejido. Los primeros están realizados habitualmente en animales grandes como la oveja al tener un tamaño de hueso parecidos y compartir ratios similares de remodelación ósea. Estos trabajos incluyen, por ejemplo, diferentes aspectos como son la evaluación *in vivo* o *ex vivo* del proceso de regeneración estudiado [11,12] o la optimización estructural de los implantes utilizados [13]. Los experimentos que evalúan las alteraciones en la composición ósea suelen realizarse con animales más pequeños, como las ratas. Es muy habitual el estudio, en estos casos, del efecto del ejercicio [14, 15] o el consumo de sustancias como la cafeína [16], en definitiva, cualquier tipo de tratamiento, hábito o enfermedad que pudiese afectar a las propiedades mecánicas del hueso. También es habitual el desarrollo de modelos que permitan predecir el comportamiento del tejido óseo [17].

Esta variabilidad en los campos a estudiar supone que los tipos de muestras a evaluar también sean de procedencias muy distintas, lo que pone en el diseño de los sistemas de medida y la selección de los ensayos más adecuados sean uno de los objetivos básicos a considerar. El tipo de hueso a emplear, por ejemplo, es de una gran importancia no solo porque sus propiedades mecánicas cambian [18], sino porque las diferencias en longitud podrían hacer no viable el uso de un utillaje [19].

1.2 Objetivos.

El presente trabajo tiene como objetivos:

- Realizar una revisión bibliográfica que permita conocer los principales factores que podrían afectar al desarrollo de un ensayo biomecánico. Este documento presentará datos sobre los procesos biológicos que tienen lugar en el tejido óseo y las principales patologías que le afectan, así como las fuentes de variación esperadas por el tipo de hueso a emplear.

- Diseñar un utillaje para un ensayo de flexión en tres puntos que sea lo suficientemente versátil para evaluar diferentes tipos de muestras. El soporte diseñado en el presente trabajo permitirá seleccionar diferentes separaciones entre los puntos de apoyo. Esto no sólo hará más sencillo la preparación del ensayo en cada muestra, sino que también permitirá el uso de diferentes tipos de hueso e incluso de distintas especies. El acceso a distintas especies, aunque sean relativamente cercanas, nos ofrece la posibilidad de trabajar con grupos de ensayos distintos, por ejemplo, ensayos genéticos con ratones o farmacológicos con conejos).
- Validar si este utillaje es adecuado con la realización de medidas experimentales en el laboratorio, caracterizando varias muestras óseas y comparando los resultados con datos obtenidos en la bibliografía.

1.3 Estructura del documento.

El documento se estructura en cinco capítulos: Introducción, Antecedentes, Diseño, Validación y Conclusiones.

El capítulo de Antecedentes hace una recopilación de diferentes fuentes bibliográficas para describir aspectos muy distintos, pero necesarios, a considerar en la fase de diseño. Se describen los procesos biológicos que tienen lugar en el tejido óseo y su relación con las propiedades mecánicas, así como las principales patologías óseas. Una vez conocidos los cambios producidos, se documentan los tipos de ensayo más frecuentes en la descripción de la biomecánica del tejido óseo y las posibles fuentes de error que habría que considerar durante el diseño del utillaje asociado.

El capítulo de Diseño presenta la evolución del prototipo objeto de este trabajo. En él, se presentan las diferentes piezas que forman el utillaje y la evolución que han tenido a lo largo de toda la fase de diseño.

La Validación incluye la presentación de datos experimentales obtenidos con este prototipo y su comparación con datos de la bibliografía para conocer si los valores son semejantes a los descritos en otros trabajos.

En el capítulo final, correspondiente a las conclusiones, se exponen las deducciones obtenidas tras llevar a cabo el estudio de manera completa.

2 ANTECEDENTES

El estudio del tejido óseo en biomecánica implica conocer diferentes cuestiones que van a afectar a las propiedades mecánicas del hueso. Los mecanismos de formación y remodelación del tejido óseo son procesos dinámicos que se producen tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, alterando la composición del hueso y modificando sus propiedades mecánicas [20, 21]. Los esfuerzos a los que están sometidos los huesos [22], la edad, el sexo [14] o los hábitos de vida [16] son los factores principales que pueden variar tanto la formación como la remodelación ósea. Las propiedades biomecánicas del tejido óseo también pueden verse alteradas por efecto de la metodología de medida. El uso de un tipo de ensayo u otro (flexión en tres o cuatro puntos, por ejemplo) [19] o el diseño de las piezas del soporte [23] podría afectar al resultado del ensayo. También hay que tener en cuenta el tipo de hueso empleado [18] o la orientación de este a la hora de realizar el test [24].

En los siguientes apartados de este capítulo se abordarán los antecedentes de la biomecánica enfocada en el tejido óseo y cómo influyen en ella las patologías más importantes. Una vez establecidos los principales procesos, se describirá los ensayos disponibles para su evaluación, así como se identificará las posibles fuentes de variación que podamos tener a la hora de hacer un ensayo.

2.1 Biomecánica del tejido óseo.

El tejido óseo se define como un tejido conjuntivo firme y duro, preparado para realizar una función de soporte locomotor y para la protección rígida de los órganos. Sus propiedades se deben a su composición, formado por una parte orgánica y otra inorgánica. La parte orgánica es una matriz extracelular, osteoide, compuesta en un 95% de colágeno y el 5% restante por diferentes tipos de polisacáridos enlazados a una cadena de proteínas [25]. Sobre el osteoide se encuentran depositadas sales de fósforo/calcio, que precipitaron durante un proceso de osificación, y que están formadas de cristales de hidroxiapatita [26]. Estas sales son el mayor reservorio que tiene el organismo de carbonato, magnesio, calcio y fósforo [25].

El tejido óseo está formado por distintos tipos de células que van a dar lugar a cambios en el hueso y, por lo tanto, en sus propiedades mecánicas. En la Figura 1 se presenta un esquema de los diferentes tipos de células que podemos encontrar en el hueso: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Los osteoblastos están localizados en la superficie del hueso (“Active OB”, Figura 1) y son las células que van a sintetizar el osteoide, la matriz orgánica del hueso (“Osteoid”, Figura 1). El osteoide se mineraliza quedando los osteoblastos rodeados del hueso mineralizado. Conforme avanza el proceso de mineralización, los osteoblastos van perdiendo su capacidad de formar hueso y pasan a llamarse osteocitos (“Old bone”, Figura 1). Estos tienen conexiones activas entre ellos denominados canaliculos que estarían en la zona mineral del hueso, representado en la Figura 1 como una malla en la zona del “Old bone”. Finalmente, los osteoclastos son el tercer tipo de célula más abundante en el tejido óseo y son los encargados de favorecer la remodelación del hueso (“Active OC”, Figura 1) para facilitar el uso de algunos de sus componentes minerales en caso de carencias o en función de las cargas mecánicas a las que están sometidos [22].

La actividad de osteoblastos y osteoclastos da lugar al proceso de remodelación, que es un proceso continuo muy importante en el organismo y que tiene dos funciones fundamentales. Por un lado, permite la adaptación a exigencias mecánicas a la que se somete el esqueleto [26]. Por otro, da lugar a

que el hueso actúe como almacén de calcio y pueda ser liberado de forma rápida para el uso en las distintas funciones vitales, ya que este elemento es esencial para la vida y su concentración en sangre está regulada.

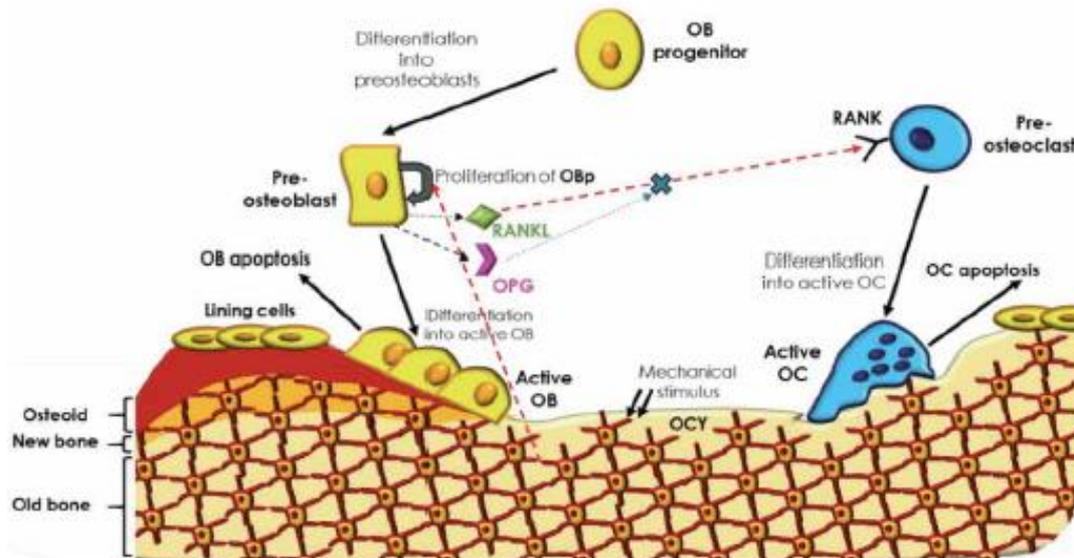


Figura 1. Esquema del acoplamiento de la actividad de los osteoclastos (OC) y osteoblastos (OB) [20].

La microestructura formada aporta la rigidez aparente al órgano para poder soportar las cargas fisiológicas a las que va a estar sometido el hueso [19]. Sin embargo, los huesos experimentan diferentes tipos de esfuerzos según su posición en el esqueleto. En la Figura 2 se presenta un esqueleto tipo de ser humano en el que se puede apreciar la gran diversidad de posiciones y dimensiones de los huesos que lo componen. Esto supone que, dependiendo de la zona, los esfuerzos mecánicos que deban soportar sean muy diferentes. Esta variabilidad en los esfuerzos, junto con otros factores como la edad, enfermedades y hábitos de conducta dan lugar a cambios en su composición. Por ejemplo, la llegada de la menopausia da lugar a un cambio muy importante en la composición de los huesos, favoreciendo la pérdida de la resistencia mecánica. Este cambio puede atenuarse con la realización continuada de ejercicio físico [15] o incrementarse con una ingesta excesiva de cafeína [16].



Figura 2. El tipo, la función y las fuerzas a las que están sometidos los huesos son muy variables. La longitud y disposición de los huesos también varía en función de la fuerza a la que estén sometidos. Esqueleto humano [27].

Los huesos más empleados en los estudios de biomecánica son los denominados como “huesos largos” como el esquema presentado en la Figura 3. Estos huesos incluyen una parte central o diáfisis y dos extremas o epífisis (Figura 3). A nivel microestructural, en este tipo de hueso se distinguen dos tipos de tejido óseo: el hueso compacto y el esponjoso o trabecular. El hueso compacto (sustancia cortical o compacta) es una masa sólida dura (“Compact bone”, Figura 3c) que se encuentra en la diáfisis o zona intermedia (Diaphysis, Figura 3). Este hueso cortical es más rígido y es la zona que soporta la mayor resistencia a los esfuerzos. El hueso esponjoso (sustancia esponjosa) se encuentra formando un sistema tridimensional de espículas (trabéculas) en el interior del hueso (“Spongy bone”, Figura 3b). Entre las trabéculas quedan espacios que son rellenados por otros tejidos, como el adiposo. La orientación de las trabéculas es paralela a los mayores esfuerzos de compresión o flexión soportados, optimizando la resistencia mecánica necesaria con el tejido necesario para soportarlas. El incremento de esfuerzos en esta zona provoca que haya una mayor densidad de las trabéculas. Este hueso esponjoso se localiza en los extremos (Epífisis, Figura 3a) actuando como un transmisor de la carga de los huesos adyacentes.

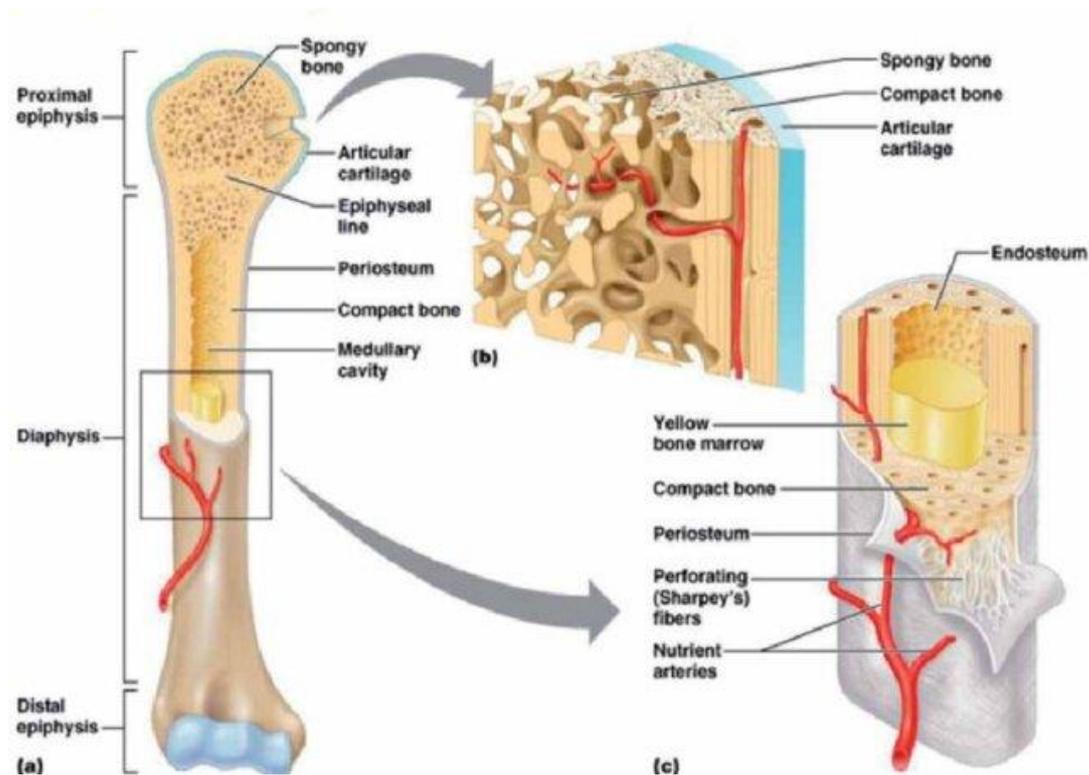


Figura 3. Zonas del hueso, tipos de tejido óseo (esponjoso y compacto) y detalle de las trabéculas [28].

A pesar de la continua remodelación llevada a cabo por osteoblastos y osteoclastos, la evolución del tejido óseo a lo largo de la vida de un ser humano es dinámica, formándose al inicio y degradándose con la edad, patologías, fármacos o por efecto de hábitos poco saludables. El hueso se va formando desde una zona cartilaginosa que se va a ir mineralizando, lo que da lugar al aumento en grosor y longitud del hueso de forma progresiva [25]. La zona de crecimiento del hueso es la placa epifisaria, formada fundamentalmente por condrocitos que van a producir la síntesis de cartílago [25]. El cartílago se va calcificando y los condrocitos mueren. Este cartílago se erosiona y los osteoblastos migran a la zona secretando la matriz ósea que se mineraliza y da lugar al hueso maduro. Todo esto tiene lugar en la placa epifisaria que es la zona activa del hueso y que se va desplazando desde el centro al extremo. Este proceso finaliza con el cierre de la epífisis, cuando la placa epifisaria deja de ser sensible a las hormonas y el hueso deja de crecer. No todos los huesos experimentan este cierre a la vez, por lo que su madurez varía a lo largo del tiempo [29].

Así, el tejido óseo es un tejido muy variable en el cuerpo humano con diferentes tipos de huesos en cuanto a su composición y longitud. Además, como ya hemos explicado, es dinámico cuya composición está modulada por diferentes cuestiones como las fuerzas a las que se somete el organismo. Estas alteraciones en la composición afectarían a las propiedades mecánicas y serían el objetivo de los estudios a los que estaría dedicado nuestro diseño. Por lo tanto, es de interés conocer alguna de las patologías más relevantes.

2.2 Las patologías del hueso y su influencia en las propiedades mecánicas.

La composición del hueso, como se ha comentado anteriormente, varía a lo largo de la vida debido a múltiples factores, lo que produce variaciones en las propiedades del mismo. A continuación, vamos a describir brevemente algunas de las patologías más habituales:

- **Osteoporosis.** Esta enfermedad se caracteriza por una disminución de la masa y una alteración de la microestructura. Tal y como se muestra en la Figura 4, esta alteración se produce por una excesiva reabsorción del hueso debida a desajustes entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos [21]. El proceso, por lo tanto, se traduce en una pérdida de densidad del hueso que da lugar a una disminución de su resistencia y una mayor probabilidad de fractura. Esta enfermedad está asociada en gran medida a la edad y el sexo, siendo más común en mujeres postmenopáusicas [20], pero también se asocia a muchas enfermedades y hábitos poco saludables, por ejemplo, el consumo excesivo de cafeína [16]. Habitualmente el diagnóstico de la osteoporosis se lleva a cabo con el uso de la densitometría. Esta prueba determina la densidad mineral ósea mediante el uso de rayos x, ultrasonidos o isótopos radiactivos.

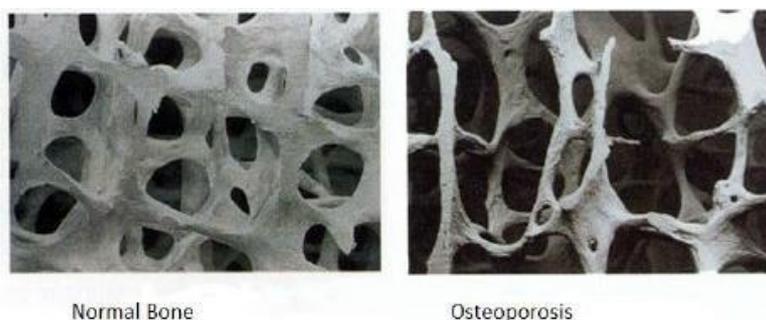


Figura 4. Imágenes de hueso trabecular normales (izquierda) y afectados por osteoporosis (derecha) [21].

- **Cáncer.** Desde el punto de vista del tejido óseo podríamos considerar dos tipos de cáncer, el primario que se genera directamente en el hueso y los que se originan en otro órgano y terminan generando una metástasis en hueso. Cada tipo de cáncer genera factores bioquímicos diferentes, que unidos al microambiente en el que se encuentran los osteoblastos y los osteoclastos, favorecen el desarrollo de estos tumores secundarios que no tienen su origen en el tejido óseo [20]. Dentro de los tumores óseos primarios, se encuentra el osteosarcoma. Este sarcoma maligno se caracteriza por producir matriz osteodica y es bastante frecuente en España con una incidencia de 3 por cada 10.000 habitantes [6]. Los síntomas son variados, aunque normalmente los pacientes acuden por un dolor localizado de varios meses de evolución y en el 10% de los casos, presenta como primer signo una fractura patológica [30]. Esta patología es frecuente en niños y adolescentes y los procedimientos de reconstrucción del hueso, una vez eliminada la enfermedad, mejoran la calidad de vida del paciente [31].

Los esfuerzos a los que están sometidos los huesos influyen en la respuesta de éstos a las metástasis óseas [32]. Las células tumorales también responden a estos estímulos que afecta a la progresión de la enfermedad, inhibiéndola [33] o fomentándola [34]. Varios autores sugieren, tras ensayos *in vivo*, que determinados esfuerzos inhiben el crecimiento de tumores en hueso [32, 35]. Esto supone que la biomecánica es fundamental para el estudio del desarrollo tumoral en los huesos ya que las metástasis van a producir una degradación del tejido.

- Osteogénesis imperfecta. La osteogénesis imperfecta es una enfermedad hereditaria que afecta a la síntesis del colágeno, el mayor componente de la matriz orgánica del hueso. Su característica clínica más típica es la fragilidad ósea [36] debido a la aparición de fibras de colágeno más delgadas y una hipermineralización del hueso [37]. El tratamiento más aconsejado es el uso de bisfosfonatos que intervengan en el ciclo de formación del tejido óseo, con seguimiento de densitometría ósea especialmente en niños [38]. Se considera que el tratamiento de esta enfermedad es difícil de evaluar y se están experimentando diferentes sustancias [37].
- Cambios en la flora gastrointestinal. Los cambios producidos en los microorganismos que se encuentran en el tracto gastrointestinal también pueden afectar al desarrollo del hueso y sus propiedades mecánicas. Estos cambios pueden estar producidos por un gran número de factores como la malnutrición, la obesidad o enfermedades metabólicas. Guss et al [39] sugieren que las alteraciones de la composición de los microorganismos darían lugar a cambios muy significativos en las propiedades mecánicas y el aumento del riesgo de fractura, mucha más de lo que se esperaría según los datos de densitometría.

La mayor parte de las patologías descritas tienen entre los síntomas más frecuentes la fractura de hueso. Por ejemplo, la sociedad española de geriatría y gerontología estima que el número de fracturas crecerá un 30% entre 2019 y 2034 debido a la osteoporosis y que el coste de estas fracturas ya supone el 3.8% del presupuesto en sanidad [5]. La clasificación de las fracturas varía según las características que se consideren. Atendiendo al lugar de la fractura, en función de donde se haya aplicado la fuerza tenemos ([40], Figura 5):

- Mecanismo directo. Si las fracturas se producen en el mismo punto en el que se ha aplicado la fuerza. Los principales tipos son:
 - Fractura contusa que da lugar a fracturas transversales (Figura 5a).
 - Fractura por aplastamiento que da lugar a fracturas de tipo conminuta (Figura 5e).
- Mecanismo indirecto. Si las fracturas se producen a cierta distancia del punto de aplicación de la fuerza. Estas son las más comunes y dentro de ellas según el tipo de fuerza que las provoque diferenciamos:
 - Flexión pura que da lugar a una fractura transversal (Figura 5a).
 - Torsión que da lugar a una fractura en espiral (Figura 5c).
 - Combinación de compresión más flexión que da lugar a fracturas con un tercer fragmento o en ala de mariposa (Figura 5d).

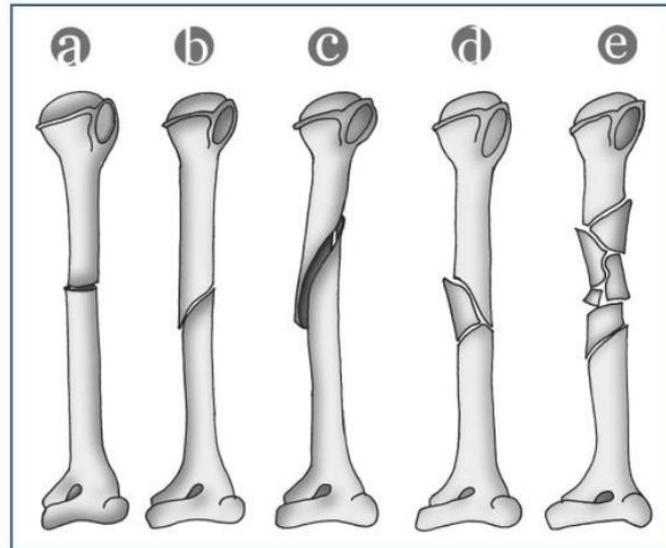


Figura 5. Clasificación de fracturas según el trazo: (a) Transversal, (b) Oblicua, (c) Espiroidea, (d) En ala de mariposa, (e) Conminuta. [40]

En definitiva, las patologías del hueso y las técnicas regenerativas están relacionadas con alteraciones de las propiedades biomecánicas del tejido óseo. Estos cambios suelen ser diagnosticados mediante, por ejemplo, densitometrías óseas. Sin embargo, estas pruebas no aportan información sobre las respuestas mecánicas del tejido óseo patológico[41]. Esto supone que los estudios referidos a tratamientos se complementan con ensayos mecánicos específicos para evaluar sus propiedades.

2.3 Ensayos mecánicos del tejido óseo.

La biomecánica permite evaluar las características mecánicas de los huesos y dar una formación muy valiosa sobre su evolución ante este tipo de enfermedades o su tratamiento. Para evitar las limitaciones *in vivo* sobre humanos y realizar una medida directa de las propiedades del hueso, se suele ensayar mecánicamente modelos óseos de animales *ex vivo*. La especie que comúnmente se usa como modelo es la rata tipo Wistar [14, 16, 41-44], podemos observar las ventajas que nos ofrece trabajar con estos tipos de animales en la tabla 1.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de ratas y ratones como organismos modelo *in vivo*. [45]

	<i>Mus musculus</i> (ratón)	<i>Rattus norvegicus</i> (rata)
Ventajas	Mayor disponibilidad de ratones genéticamente modificados para imitar muchos procesos de enfermedades	Más grandes que el ratón (aproximadamente 10 veces más)
	Cepas altamente inmunocomprometidas disponibles para el injerto de células/tejidos humanos	Mayor volumen de sangre
	Relativamente barato de mantener y almacenar (muchos ratones pueden almacenarse juntos)	Organos internos con proporciones parecidas a los de los humanos
	Más barato para tratamientos farmacológicos ya que se precisan cantidades más pequeñas de fármaco (aquellos cuya dosis se refiera al peso del animal)	Casi todos los genes humanos asociados a enfermedades tienen genes de ratas equivalentes
		Más dóciles, sociables y con más duración de vida que los ratones
Inconvenientes	Tamaño de cuerpo pequeño	Disponibilidad limitada de variantes genotípicas y fenotípicas-difícil para modelos de investigación de enfermedades
	Volumen de sangre pequeño	Mayor coste de mantenimiento-alimentación y habitáculo para vivir

El procedimiento habitual, por lo tanto, es la cría de estos animales de forma que reproduzcan las condiciones que se quiere investigar en humanos. Por ejemplo, es habitual usar ratas hembras a las que se les ha eliminado los ovarios para extrapolar los resultados a mujeres en el periodo de menopausia [14], aplicando tratamientos o hábitos a comparar, por ejemplo, la realización de terapias físicas [44].

Los ensayos biomecánicos más comunes son tracción, flexión y compresión. Los datos obtenidos en cualquiera de estos test están considerados como medidas estándar para definir la estructura y las propiedades funcionales del esqueleto [9]. Los ensayos de tracción, como la de la Figura 6, necesitan un tamaño de hueso largo para asegurar una precisión adecuada [19]. Esta limitación es más importante en tejido óseo de tipo esponjoso ya que la longitud debe ser lo suficientemente grande para que la estructura trabecular sea tratada como un continuo [19]. Harrigan et al [46] sugiere que en este tipo de ensayos precisan una anchura en el hueso de 4 a 8 mm. Además, el esfuerzo de tensión no es el habitual en varios tipos de huesos, por ejemplo, una vértebra suele trabajar ante esfuerzos de compresión, por lo que un ensayo a tracción podría no ser adecuado o tendría que estar complementado por otro de compresión [47].

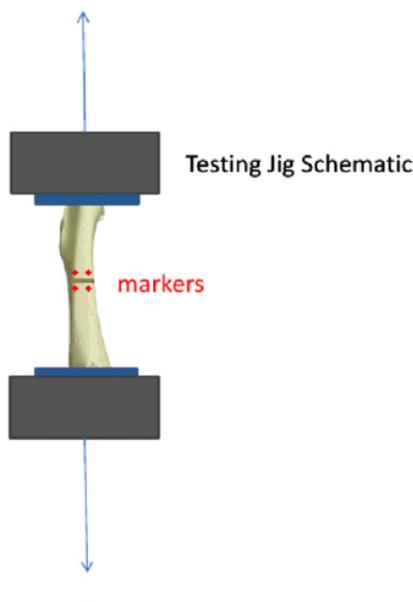


Figura 6. Prueba de tracción en un hueso [9].

Los ensayos de compresión (Figura 7) suelen ser adecuados para determinados tipos huesos que soportan este tipo de esfuerzo durante la función musculoesquelética del cuerpo, por ejemplo, las vertebrae. Estos huesos se montan habitualmente en la máquina de ensayo tal y como son extraídos del espécimen (Figura 7). La forma irregular produce un apoyo complejo en las zonas donde se aplica las fuerzas. Esto da lugar a un “efecto terminación” que produce una acumulación de la presión y, por tanto, concentradores de tensiones, en determinados puntos de contacto hueso-máquina de ensayo [47]. En consecuencia, la fuerza a rotura o alguna de las propiedades mecánicas como el módulo de Young podrían verse alteradas [19]. Aunque se ha sugerido el uso de resinas que pueden evitar este tipo de problemas, esto no asegura que desaparezcan los esfuerzos diferenciales en las zonas terminales del hueso [47].

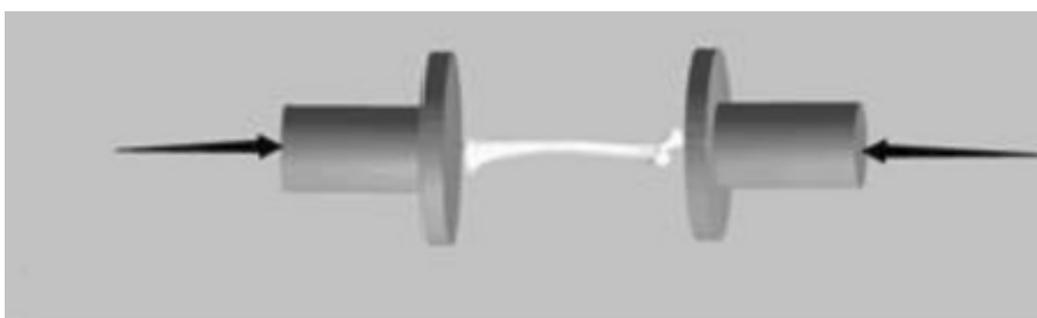


Figura 7. Test de compresión en hueso [47].

Los ensayos de flexión son los más utilizados en los ensayos *in vivo* y *ex vivo* al ser menos limitantes en longitud que el resto [19]. Este tipo de test puede ser en dos, tres o cuatro puntos (Figura 8), aunque en los ensayos con hueso el más habitual es el de 3 puntos [14, 16, 18, 44, 48, 49].

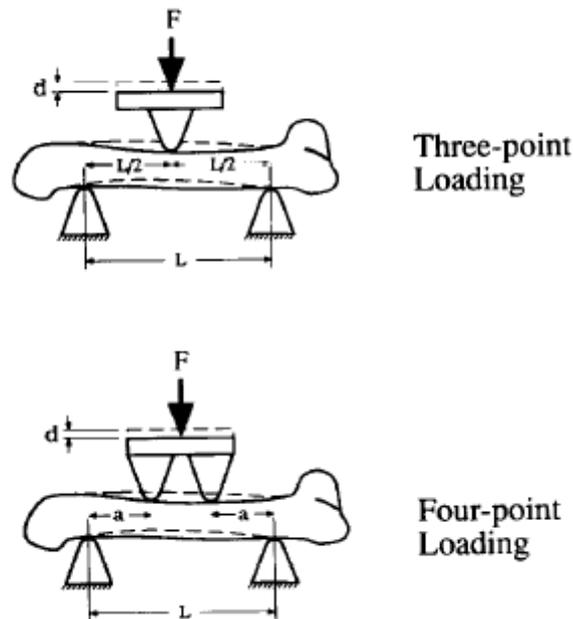


Figura 8. Test de flexión en 3 y 4 puntos en hueso [19].

El test de dos puntos se usa en ingeniería de materiales para estudiar la aparición y el desarrollo del pandeo local [50] en materiales como papel o plástico. Los test de tres y cuatro puntos son los más habituales en los ensayos de biomecánica, y aunque la longitud de la muestra en estos estudios es menos limitante que en el caso del ensayo de tracción, también debe ser suficiente para evitar que el desplazamiento sea de cizaña y no de flexión. Se estima que para que la mayor parte del desplazamiento sea debido a la fuerza de flexión la longitud debe ser aproximadamente 16 veces el grosor del hueso [19].

El ensayo de flexión en 3 puntos es el más habitual por su sencillez, pero tiene la desventaja de crear potenciales tensiones de cizaña cerca de la sección media del hueso. Por el contrario, con el ensayo en 4 puntos se evita este efecto, sin embargo, se requiere que la fuerza ejercida sea igual en los dos puntos de aplicación, lo que es muy complejo debido a la forma irregular de los huesos.

Otro tipo de ensayo de flexión en tres puntos es el ensayo con muescas (“notched 3 point bending test”). Este ensayo se utiliza para conocer la resistencia a la rotura. Consiste en realizar un test de tres puntos al que se realiza una pequeña muesca en la muestra que se va a ensayar, lo que hace que los esfuerzos se concentren en ese punto [51].

El diseño para el presente trabajo se centrará en una estructura para un test de tres puntos para la evaluación de huesos de ratas Wistar. Los test de flexión dan lugar a curvas de fuerza-deformación que permiten el cálculo de diferentes indicadores que caracterizan el hueso. La Figura 9 muestra el esquema de una curva fuerza-deformación donde se han marcado los puntos más característicos a considerar.

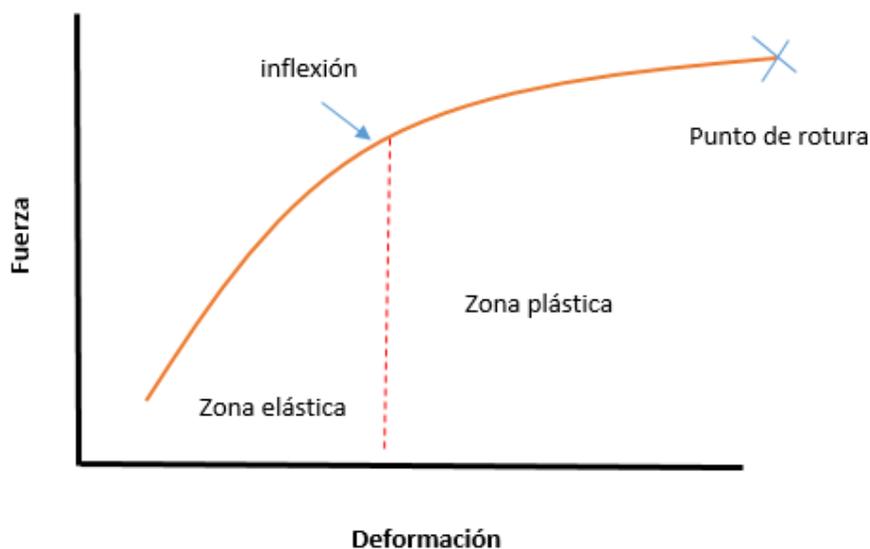


Figura 9. Esquema de las curvas de Fuerza-Deformación en hueso.

Estas curvas, como en todos los materiales, son de tipo logarítmico donde se pueden distinguir dos regiones: la parte elástica y la plástica. Ambas zonas están delimitadas por el punto de inflexión (“yield”, en inglés). Teóricamente, la parte elástica es la que da lugar a una deformación reversible, y la plástica es aquella en la que la deformación es permanente. En el caso del hueso la curva finalizaría con el punto de rotura. La pendiente de la curva en la zona elástica mide la rigidez del hueso y estimaría el módulo de Young del material o módulo de elasticidad longitudinal [19]. El módulo de Young es una característica intrínseca de cada material que permite caracterizar el comportamiento de un material elástico. Se estima como la relación entre la tensión en la dirección de aplicación de una fuerza y la deformación correspondiente. Este parámetro permite distinguir los huesos de forma relativa, un hueso más maduro (por ejemplo, de un adulto) necesitaría más fuerza que uno en proceso de formación por osificación intramembranosa (por ejemplo, el de un niño) para una misma deformación, sin embargo, el módulo de Young debería ser similar. Este valor varía según en la dirección en la que se haga la fuerza, por lo que se requiere estandarizar la metodología de medida [43].

En la curva de fuerza-deformación es habitual usar como referencia para comparar los tratamientos la fuerza empleada en el punto de inflexión, el cambio entre zonas, y en el punto de rotura [15]. El punto de inflexión, por ejemplo, se considera un umbral a partir del cual podría haber un daño permanente en el hueso. La cantidad de deformación producida a partir del punto de inflexión (Figura 9), en la zona plástica, da información sobre la “fragilidad” del hueso, aunque esta zona suele ser corta en términos de deformación [19, 44]. Finalmente, el área bajo la curva es una medida de la energía necesaria para realizar la fractura, es lo que se define como resistencia. Todos estos parámetros: Módulo de Young, fuerza en el punto de inflexión y en el punto de rotura, fragilidad o resistencia permiten, por lo tanto, una descripción precisa del hueso desde un punto de vista mecánico. Además, pueden ser empleados para comparar el efecto de diversos tratamientos y podrían ser correlacionados con estudios histológicos o de composición mineral, por ejemplo, en el estudio de Huang [44] sobre el efecto beneficioso del ejercicio.

El procedimiento para la obtención de estos datos debe estar estandarizado en varias cuestiones. La primera es el tipo de hueso que se va a emplear ya que, incluso en un mismo individuo la respuesta mecánica que se puede encontrar entre especímenes óseos es ligeramente diferente o su relación con indicadores de composición de hueso ([18], Figura 10).

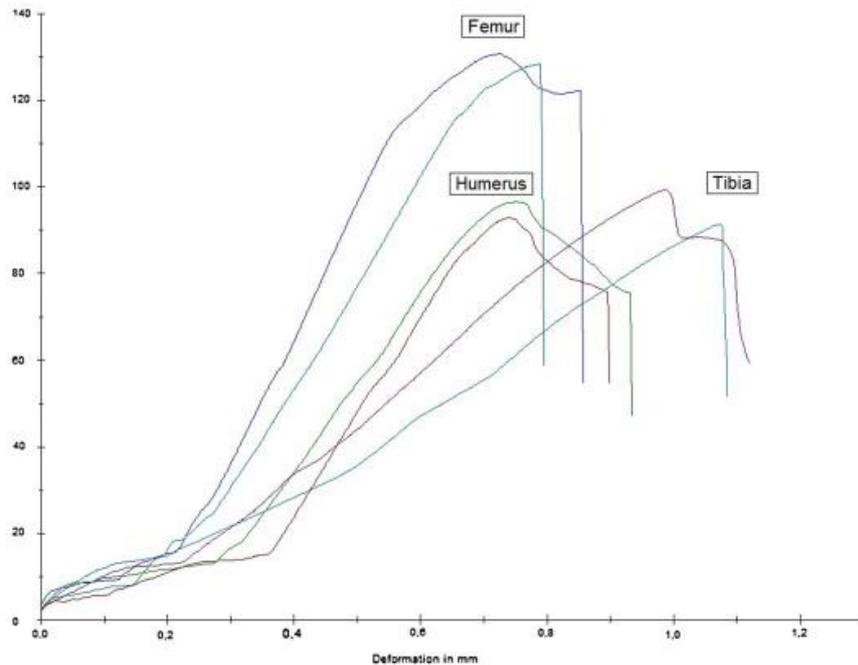


Figura 10. Curva fuerza-deformación en 3 tipos diferentes de hueso de rata Wistar [18].

En la Figura 10 se representan las curvas de fuerza-deformación de un fémur, un húmero y una tibia de un mismo sujeto. En el eje y de esta gráfica se representa la fuerza en newtons (N) y en el eje x la deformación en milímetros (mm). Observando las curvas de cada una de las muestras vemos que el fémur es el hueso que rompe a mayor fuerza, siendo éste el más resistente. Sin embargo, el húmero y la tibia rompen a una fuerza aplicada similar, lo que nos indica que no presentan diferencias significativas en términos de resistencia. Si nos fijamos en los valores que alcanzan cada uno de los huesos en el eje x vemos que la tibia es la muestra que obtiene mayores deformaciones, lo que implica que es el hueso más plástico y flexible. Por el contrario, el fémur es, de los tejidos ensayados, el más rígido, ya que es el que menos deformaciones soporta antes de llegar a la fractura. Recordemos que la remodelación ósea implícita en el hueso, adapta la estructura ósea a las necesidades fisiológicas y mecánicas en la posición del esqueleto en la que se encuentre. Lo que aparentemente no influye es la zona (izquierda o derecha) de la elección de fémur, tibia o húmero dentro de un mismo individuo [18].

2.4 Diseño del utillaje en distintos modelos óseos.

La selección de una determinada especie para realizar un ensayo biomecánico depende del objetivo que tenga nuestro estudio. Los tamaños de los animales empleados en estos estudios van desde animales de muy pequeño tamaño, como ratones, hasta animales con gran desarrollo como una oveja o un perro. Por lo general los ratones suelen ser empleados para estudios genéticos, mientras que para estudios relacionados con la osteoporosis o el uso de fármacos precisarían de especies más grandes como las ratas y los conejos. Las especies más grandes (ovejas, perros) suelen emplearse para el estudio de tratamientos ortopédicos [52]. Esto supone que las dimensiones del utillaje deben estar adaptadas a la especie seleccionada.

La Figura 11 presenta un esquema tipo de los soportes que se utilizan en los ensayos biomecánicos. Éstos tienen forma redondeada para minimizar los esfuerzos de cizallamiento [24]. Los radios de curvatura de cada pieza que forman el soporte dan lugar a variaciones en los resultados. Hou et al [23]

describe las variaciones esperadas en el módulo de elasticidad dependiendo del radio del punzón para aplicar la fuerza en el sistema de tres puntos, que podría ser variable en función de la dimensión de la muestra que se considere. Los valores obtenidos en el Módulo de Young y la máxima carga se incrementaron con el aumento en el radio del punzón [23]. El trabajo de Hou et al [23] se lleva a cabo con materiales industriales, no naturales, y por lo tanto más homogéneos que los huesos, cuya variabilidad es mucho mayor, lo que pone en evidencia la importancia del diseño.

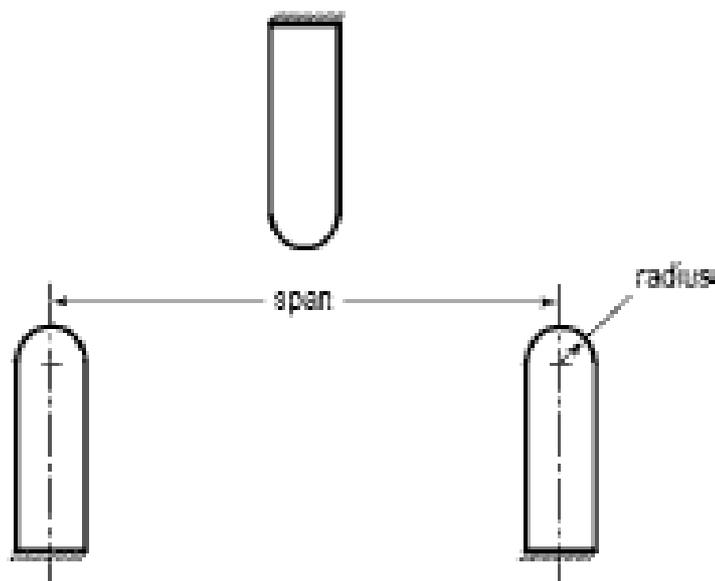


Figura 11. Esquema del soporte estándar empleado en ensayos biomecánicos. [52]

La especificidad de cada modelo óseo va a estar determinado por la longitud y el grosor que tenga el hueso. La relación entre la longitud de la muestra y su diámetro es un factor a considerar. Algunos autores recomiendan una relación de 10:1 [24], 16:1 [19], 20:1 [53]. Estas variaciones limitarían la longitud que puede haber entre los apoyos.

Las ovejas son los animales de mayor tamaño en los ensayos biomecánicos. Además de ser necesarios para las intervenciones ortopédicas, se considera que tienen un perfil hormonal similar al de las mujeres y algunas estructuras de hueso son similares a las de los humanos [24]. Sin embargo, pueden dar problemas de transmisión de enfermedades que se evitan embalsamando los huesos, aunque esta técnica podría afectar a sus propiedades mecánicas [53]. Los huesos de las ovejas empleados en los ensayos de flexión, además, pueden estar limitados por su simetría, la tibia se considera más adecuada que el fémur [24]. La longitud de soporte se adapta en este caso al grosor del hueso, manteniendo la relación indicada más arriba [24] o se usa una sección de hueso que se podría evaluar como el de una especie de menor tamaño [53]. El conejo es una especie que va a tener un tamaño intermedio en los huesos empleados [54]. En el caso de esta especie se recomienda una separación entre soportes de unos 55 mm, empleando un radio de 6 mm en los apoyos redondeados [52]. En el caso de las ratas, de tamaño algo menor que los conejos, no es habitual encontrar la descripción del soporte en la bibliografía. Leppänen [43] empleó una longitud de 37 mm con un radio de 4 mm. En este caso, las dimensiones fueron superiores a los de otros autores que recomiendan una distancia de 15 mm y un radio de 2 mm [18, 19] o sensiblemente superior [55].

3 DISEÑO DEL UTILLAJE PARA ENSAYOS DE FLEXIÓN EN TRES PUNTOS

En este capítulo se desarrollará el diseño de cada una de las piezas que conforman el utillaje para la realización de ensayos en 3 puntos en modelos óseos de roedores y algunos lagomorfos, incluyendo aquellas que sirven para el soporte del hueso y la que aplicará la carga desde una máquina de tracción-compresión. Se mostrará tanto la evolución del diseño de cada una de las piezas como el resultado final, explicando cada uno de los cambios realizados. El diseño de las mismas se ha realizado con FreeCAD (desarrollado por Juergen Riegel y Werner Mayer, y lanzado por primera vez en 2002) en su versión 0.17, un software de modelado 3D de código abierto.

En la Figura 12 podemos ver el montaje completo del utillaje desarrollado. Este está formado por una estructura inferior (A) sobre la que se disponen los apoyos (B) en los que colocaremos la muestra que vamos a ensayar. En la parte superior, aparece suspendido la pieza que, enroscada en la máquina de tracción-compresión, aplicará la fuerza sobre nuestro tejido óseo (C). Los planos del utillaje se encuentran en el Anexo 1 del presente documento.

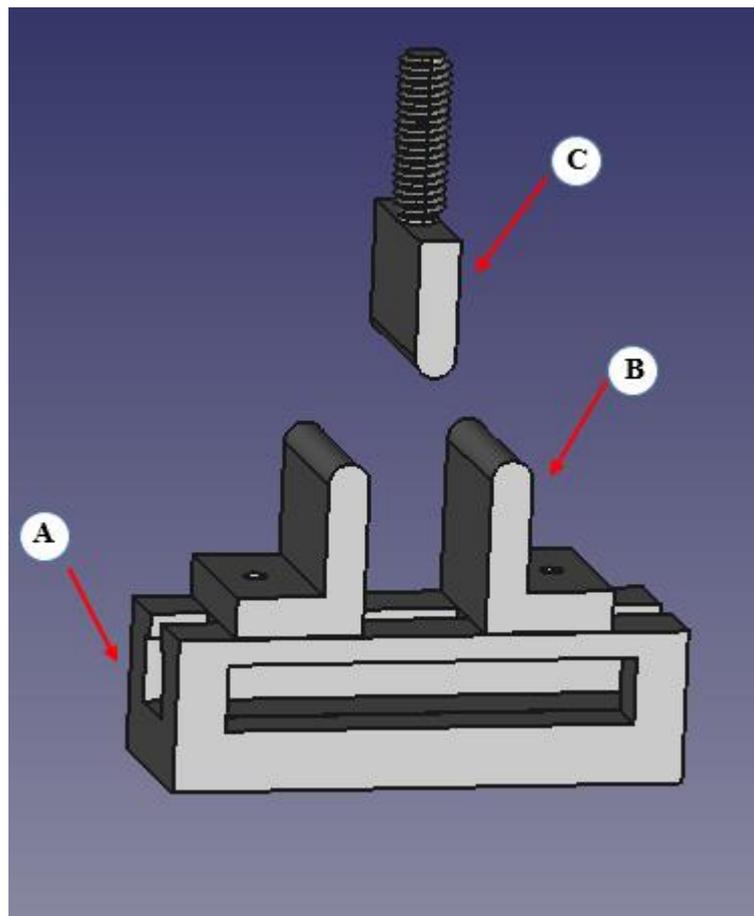


Figura 12. Soporte final modelado en FreeCAD: (A) Estructura Inferior, (B) Apoyos, (C) Pieza para aplicar la fuerza.

3.1 Soporte inferior del utillaje.

La estructura inferior del utillaje se corresponde con la pieza (A) de la figura 12. Es la base de nuestro soporte, ya que, sobre ella se fijarán los apoyos en los que colocaremos la muestra que vayamos a ensayar. Por ello, necesitamos que sea una pieza firme y compacta.

3.1.1 Estructura general de la pieza.

Haremos un recorrido cronológico de la evolución de esta primera pieza.

Esencialmente, se trata de un prisma macizo que, inicialmente, tenía una corredera (1) en la parte superior y una abertura en las caras laterales (2). Ambas partes aparecen señaladas en la figura 13.

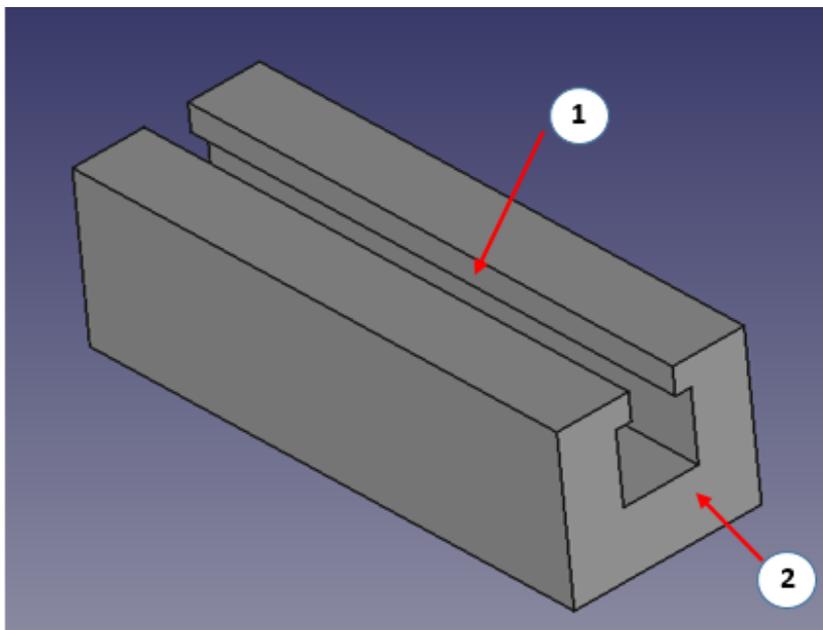


Figura 13. Estructura inferior. (1) Corredera superior, (2) Abertura frontal.

Para entender la utilidad de sendas partes es necesario que tengamos una idea de cómo se ensamblan los soportes con la base, por lo que se explicará brevemente el funcionamiento en conjunto, entrando más en detalle de cada una de las partes en su respectivo capítulo.

La base del soporte es la encargada de albergar los apoyos sobre los que se coloca la muestra. Estos apoyos poseen una guía, que debe encajar en la ranura superior de la misma (1 en figura 13), esta guía lo que nos permite es desplazar los apoyos a lo largo del soporte, pudiendo así modificar la distancia a la que se colocan. Una vez colocados debemos fijarlos en la posición deseada. Para ello, los apoyos cuentan con un agujero pasante por el que se introduce un tornillo. Gracias al tornillo y su tuerca conseguiremos que estas piezas se queden fijas en nuestra base.

Una vez que sabemos cómo se ensamblan los dos tipos de pieza principales del utillaje, pasamos a comentar la utilidad de cada una de las partes de este primer prototipo:

- 1) La corredera nos ofrece la posibilidad de ajustar los apoyos a diferentes longitudes de hueso, lo que hace que el utillaje desarrollado sea mucho más versátil y pueda ser utilizado para ensayar diferentes modelos óseos de pequeños animales.

- 2) Esta abertura con forma de “U” tiene una doble función, por lo que diferenciaremos dos partes: la zona superior (más estrecha) y la zona inferior (más ancha).

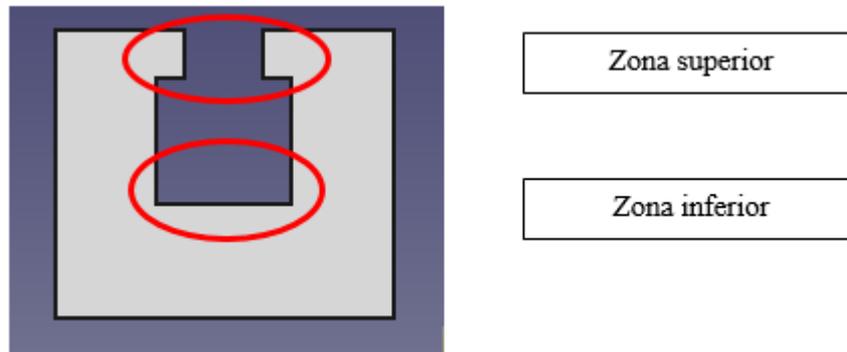


Figura 14. Zonas de la abertura frontal.

- Por la zona superior pasará la guía de los apoyos. Es importante que esta zona esté bien dimensionada y ajustada ya que, de lo contrario, a la hora de aplicar la fuerza sobre el espécimen de ensayo, el apoyo podría ser inestable, invalidando el ensayo de flexión en 3 puntos. En este utillaje se ha elegido 1 mm de holgura entre el tamaño de la guía y del agujero.
- Con respecto a la zona inferior de esta abertura, su función es albergar la parte sobrante del tornillo y la tuerca, que utilizamos para fijar el apoyo. Idealmente está pensado para emplear un tornillo de 25mm de longitud, pero en la práctica podría utilizarse cualquier longitud comprendida entre 19 y 26 mm. La dimensión elegida para esta abertura es de 14mm, por lo que cualquier tuerca con un diámetro de cabeza inferior a esta medida sería válida.

En este primer prototipo puede ser complicado apretar los tornillos que fijan nuestros soportes, por lo que se decidió incluir una abertura lateral (3 en la figura 15), que no solo nos facilita el fijado de las correderas, sino que también nos ofrece la posibilidad de apretar con arandelas cualquier tipo de tornillo de métrica inferior al agujero pasante de los apoyos.

Podemos ver el resultado final de esta primera pieza en la figura 15, donde además aparece señalada la modificación que la diferencia del primer prototipo.

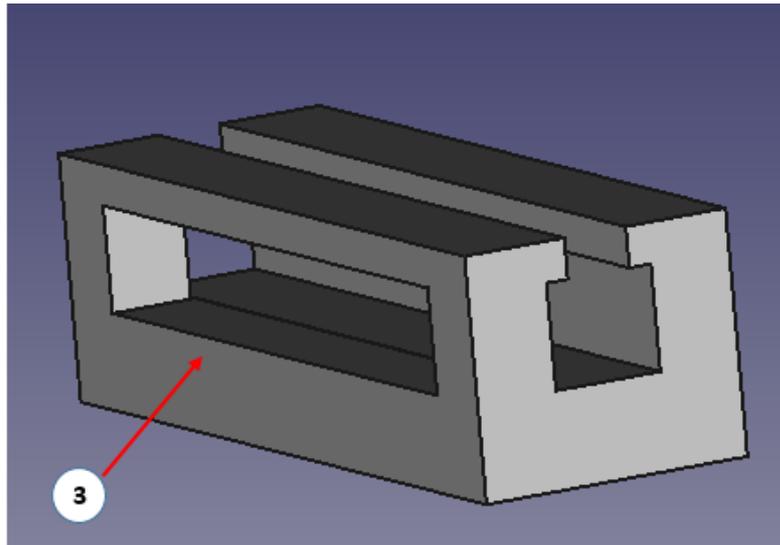


Figura 15. Pieza final correspondiente a la estructura inferior. (3) Abertura lateral introducida en el nuevo prototipo.

Finalmente podemos ver la evolución de la estructura inferior del utillaje en la figura 16.

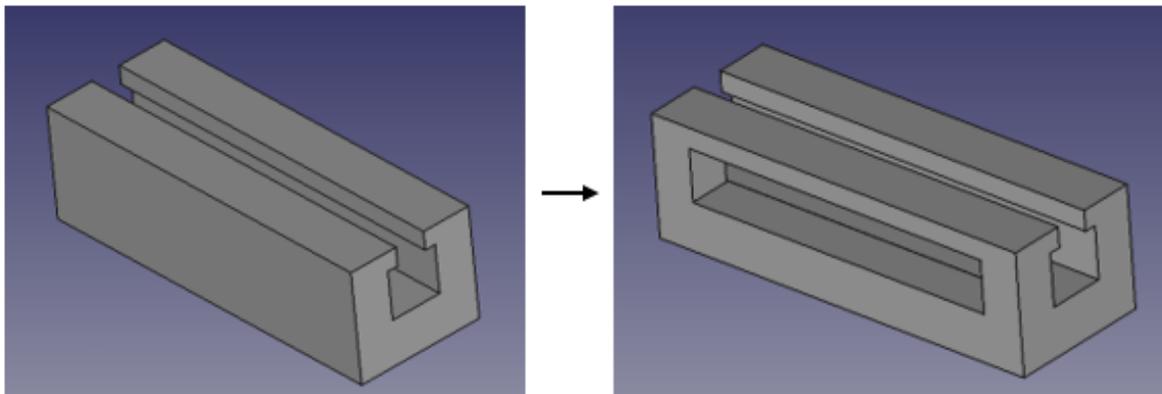


Figura 16. Evolución de la base del utillaje.

3.1.2 Dimensiones de la pieza.

Una parte importante del diseño de esta primera pieza es seleccionar las dimensiones de la misma. Para ello se ha utilizado como referencia un fémur de rata Wistar segmentado, lo que nos permite poder medir las dimensiones de este hueso con el programa de diseño 3D. La geometría de este modelo óseo fue obtenida mediante la realización de una micro-tomografía en un equipo COUGAR (Yxlon, Aachen, Alemania). Las imágenes fueron segmentadas utilizando el software de código abierto Invesalius (CTI, Campinas, Brasil).

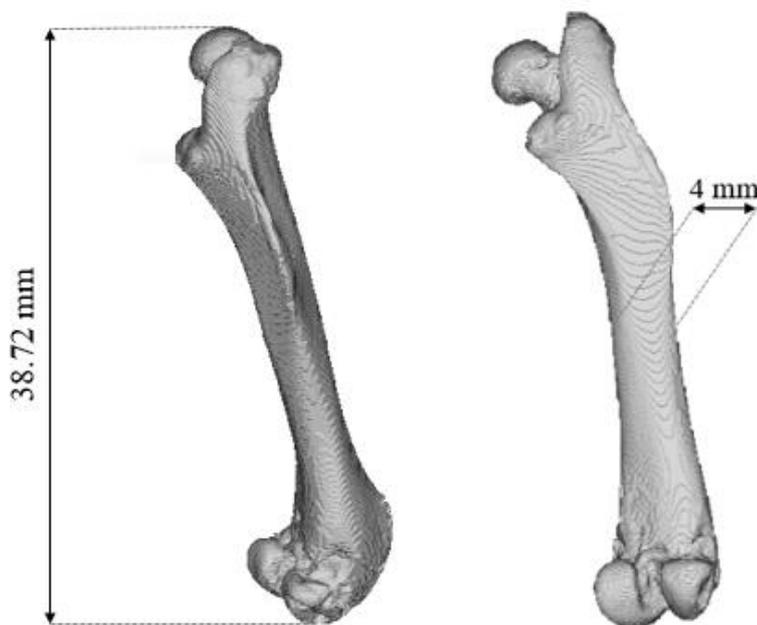


Figura 17. Largo y ancho del fémur segmentado.

Debemos tener en cuenta que las dimensiones de los tejidos óseos pueden variar dependiendo de la raza, el sexo o la edad del animal, por lo que estas medidas únicamente nos sirven como una referencia inicial.

Uno de los objetivos de diseño de nuestro utillaje es que pueda utilizarse para realizar el ensayo de flexión en 3 puntos a diferentes modelos óseos, por esta razón tomamos también como referencia las longitudes medias de los modelos que son comúnmente sometidos a este ensayo. Estas medidas aparecen reflejadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Huesos comúnmente ensayados en test de flexión en tres puntos. Se indica el dato medio de longitud y el tipo de hueso empleado en cada ensayo.

Tipo de hueso	Longitud (mm)	Referencia
Tibia (Rata Wistar hembra)	38	[14]
Cúbito (Rata Wistar hembra)	28-29	[14]
Fémur (Rata Wistar macho)	21-23	[16]
Fémur (Rata Wistar macho)	42	[48]
Fémur (Rata Sprague Dawley macho)	37	[43]
Fémur (Ratas Wistar macho y hembra)	24-26	[42]
Tibia (Ratas Wistar macho y hembra)	29-31	[42]
Fémur (Conejo blanco de Nueva Zelanda)	70-100	[56]
Tibia (Conejo blanco de Nueva Zelanda)	70-100	[56]
Tibia (Conejo blanco de Nueva Zelanda)	70-100	[54]

Teniendo en cuenta ambas fuentes se establece que las dimensiones de la estructura inferior son 100x35x30 mm a nivel global. La longitud de nuestra base (100mm) ha sido seleccionada con el objetivo de que nos permita, a priori, poder utilizar nuestro utillaje para ensayar cualquier modelo óseo de los presentados en la Tabla 2. No obstante, las piezas que nos limitan a la hora de saber qué huesos vamos a ser capaces de ensayar y cuáles no, son los apoyos, ya que se tiene que poder situar el hueso horizontalmente en el espacio existente entre ambos, es decir, el espacio existente entre ambos apoyos debe ser como mínimo el que aparece en la Tabla 2.

Tal y como se comentó anteriormente, las dimensiones de la pieza están detalladas en su correspondiente plano disponible en el Anexo 1.

3.2 Apoyos.

Los apoyos se corresponden con la pieza (B) señalada en la figura 12 en la que se representa el conjunto del utillaje ensamblado, contamos con dos apoyos idénticos.

3.2.1 Estructura general de la pieza.

Al igual que con la pieza anterior, realizaremos una revisión cronológica de la evolución de esta pieza.

Estos apoyos son piezas con forma de “L” que disponen de una base rectangular y que principalmente cuentan con tres zonas de interés: la terminación curva de la zona elevada (1 en Figura 18), el agujero pasante de la base (2 en Figura 18) y la guía colocada en la parte inferior de la pieza (3 en Figura 18).

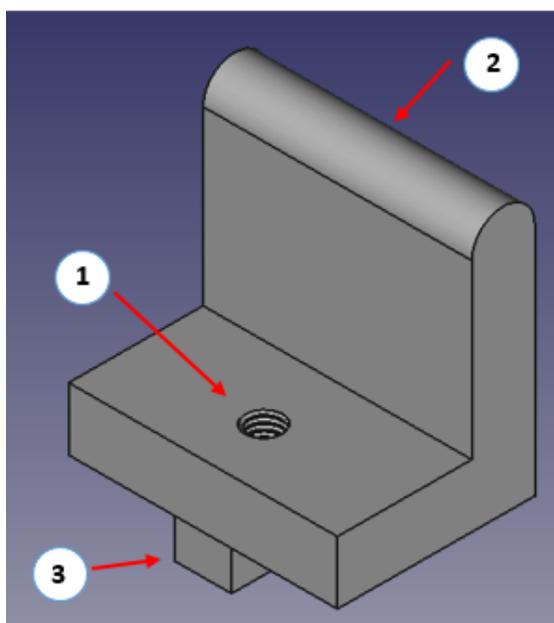


Figura 18. Zonas de interés de los apoyos. (1) Agujero pasante, (2) Terminación curva de la zona de apoyo, (3) Guía.

- 1) En un primer prototipo, esta base contaba con un agujero roscado completamente pasante por el que se introduciría el tornillo que fijará los apoyos a la base en la posición deseada. La principal limitación que tiene colocar un agujero roscado es que únicamente podremos utilizar un tornillo con la métrica de la rosca del agujero. Finalmente se decidió realizar un agujero pasante sin esta rosca, ya que a nivel funcional no nos aporta nada y podemos eliminar costes. Además, de esta manera podemos utilizar cualquier tornillo que cumpla las especificaciones mencionadas con su correspondiente arandela.
- 2) El diseño de la zona elevada de esta pieza, sobre la que descansará la muestra a ensayar, se ha hecho de acuerdo a los datos que disponíamos de la literatura. Al igual que en los artículos [18, 43, 55] se ha optado por una terminación redondeada sin ningún tipo de muesca. Este tipo de terminación redondeada hace que se minimicen los efectos de los bordes afilados o esquinas puntiagudas que podrían actuar como puntos de concentración de tensiones. Según [19] la relación entre la longitud y el grosor del hueso debería ser 16:1 para tener una determinación adecuada, sin embargo, este ratio en los tejidos a muestrear podría no cumplirse dada la

irregularidad del hueso. Con respecto a los valores de la Tabla 2 de longitud, para que esta relación se mantuviese el grosor de los huesos debería estar entre 1.3 hasta 2.6 mm, en cambio en aquellos artículos en los que se describe el grosor del hueso este es muy superior [16] entre 21 y 23 mm de longitud y de 7.5 a 9 mm de grosor; [48] 42 mm de longitud y 14.9 mm de grosor). La norma ISO178:2020 [57] para determinar las pruebas de flexión de los plásticos, indican que los apoyos deberían ser de 2 mm para probetas menores de 3 mm y de 5 mm para probetas mayores de 3 mm. Teniendo en cuenta estos datos se optó por un radio de 4 mm que aseguraría un apoyo suficiente para valores altos y algo más inferior del de las normas ISO que podría servir para los grosores menores. Este radio es el empleado por Leppänen [43] para una longitud de hueso de 37 mm (que no indica grosor) pero inferior a los usados en Prodingler [18] y Osuna [55] que estuvieron entre 2 y 2,5 mm. Estos dos últimos autores no indican ningún tipo de dimensión de los huesos empleados, pero teniendo en cuenta los valores de los trabajos de Santos [16] y Trebacz [48] el grosor, probablemente, sería mayor de los 3 mm.

- 3) En la parte inferior de la pieza encontramos la guía, mencionada en el apartado anterior. Esta parte permite que el apoyo se comporte como una pieza corredera, permitiendo el desplazamiento horizontal de la misma por la muesca superior del soporte del utillaje. Esto hace que podamos colocar el apoyo en diferentes posiciones a lo largo de la base.

La mayoría de estas partes no han sufrido grandes cambios a lo largo de la etapa de diseño de esta pieza, la variación más significativa se encuentra en el agujero pasante, que como ya se ha comentado, inicialmente estaba roscado y finalmente se optó por un agujero sin rosca. Aunque a simple vista pueda parecerlo, este no es el único cambio que se ha llevado a cabo, también se modificó el radio de curvatura de la zona en la que va apoyada la muestra y la longitud de la zona más elevada, ya que inicialmente, la pieza era más corta.

Podemos ver la evolución de esta pieza en la figura 19.

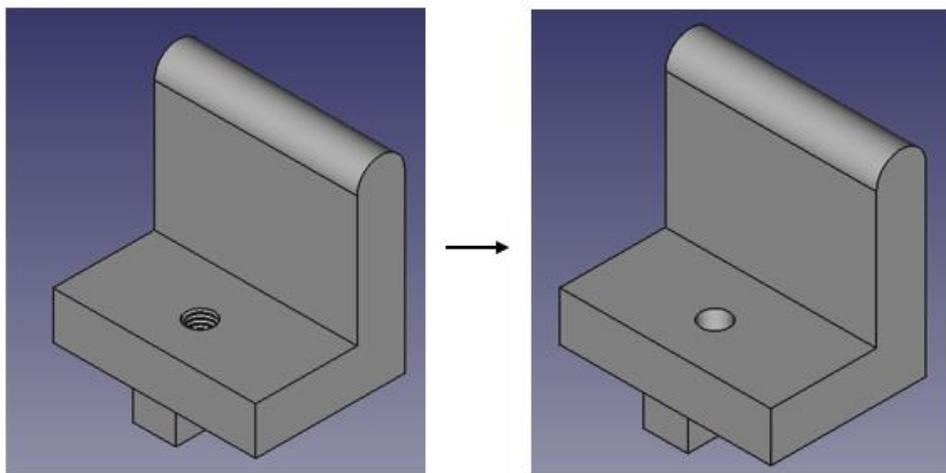


Figura 19. Evolución de la pieza de apoyo.

3.2.2 Dimensiones de la pieza.

Las dimensiones de esta pieza son 34 mm de ancho x 2.5 mm de profundo x 3.9 mm de alto (contando con la guía inferior). Podemos ver estas dimensiones en más detalle en el plano de la pieza disponible en el Anexo 1.

Comparando estas dimensiones con las de la base podemos ver que la distancia útil de trabajo que queda para colocar la muestra es de unos 50mm, es decir, esta sería la máxima separación que podría existir entre nuestros apoyos. Podremos ensayar huesos de una longitud inferior a esta separación e incluso algunos de mayor tamaño en los que a la hora de realizar el test de flexión en tres puntos coloquemos los apoyos a una distancia inferior o igual a 50 mm, como se hace en [54,56], donde para ensayar los fémures y tibias de un conejo se colocan los apoyos a una distancia de 50 mm, en el caso del primer artículo, y 30 mm en el caso del segundo.

Estas dimensiones aseguran el poder realizar el ensayo de flexión en tres puntos a todos los tipos de huesos que hemos descrito en la Tabla 2, lo que supone cubrir, a priori, las dimensiones más comunes para modelos óseos de roedores y algunos lagomorfos que aparecen en la bibliografía.

Con respecto a las dimensiones del agujero para el tornillo, se trata de un agujero de 4.5 mm de diámetro, este agujero no está roscado por lo que podría utilizarse cualquier tornillo siempre y cuando tenga un diámetro inferior al indicado y una longitud de acuerdo a lo comentado en el apartado anterior. Idealmente está pensado para utilizar un tornillo de métrica M4.

3.3 Pieza para aplicar la carga.

Esta última pieza se corresponde con la pieza (C) de la figura 12 representada al inicio del capítulo. Es la más sencilla, está diseñada para ir colocada en la máquina de tracción-compresión que realiza el ensayo y su utilidad es la de aplicar la fuerza deseada a la muestra.

3.3.1 Estructura general de la pieza.

Esta pieza consta de dos partes bien diferenciadas, un prisma rectangular con uno de sus extremos curvo (1 en la Figura 20) y una varilla roscada colocada en el centro de la parte inferior de la pieza (2 en la Figura 20).

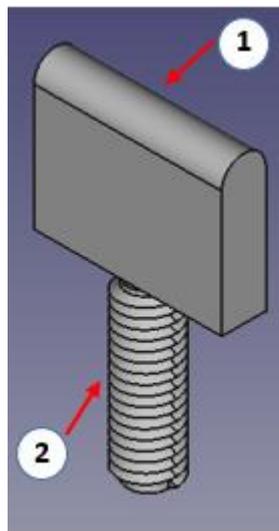


Figura 20. Pieza destinada a aplicar la carga. (1) Zona curva en contacto con la muestra, (2) Varilla roscada.

- 1) La zona curva de esta pieza es la que estará en contacto con la muestra durante la realización del ensayo.
- 2) Esta varilla roscada es el aplique que nos permite colocar la pieza en la máquina de tracción-compresión que realizará el ensayo. En un principio está diseñada para ser utilizada en la máquina de ensayos 858 MTS Minibionix (MTS Systems, Minnesota, Estados Unidos) y por tanto la varilla roscada está diseñada con la métrica correspondiente. Sin embargo, podría adaptarse fácilmente a cualquier máquina de tracción-compresión mediante el diseño de un acoplador de roscas hembra-macho con la métrica de salida adecuada.

A diferencia de las dos piezas anteriores, esta última no ha sufrido grandes cambios en su fase de diseño, simplemente, se ha aumentado ligeramente su tamaño para que sus dimensiones estuvieran en sintonía con las del resto del utillaje.

3.3.2 Dimensiones de la pieza

Las dimensiones generales de la pieza, sin contar la longitud de la rosca, son 34 mm de largo x 8mm de ancho x 27mm de alto (52 mm de alto si contamos la longitud de la varilla roscada). Al igual que con las piezas anteriores, se puede consultar dichas dimensiones en detalle en el plano de la pieza disponible en el Anexo 1.

El radio de curvatura de la zona que estará en contacto con la muestra durante el ensayo es de 4mm. Para determinar este radio se ha tomado como referencia los artículos [18, 43, 55] cuya terminación de las piezas que están en contacto directo con la muestra también tienen estas dimensiones.

Finalmente, las dimensiones de la varilla roscada se han visto determinadas por las características del aplique de la máquina que se ha utilizado para la validación del utillaje, la 858 MTS Minibionix (MTS Systems, Minnesota, Estados Unidos) en este caso. Esta varilla cuenta con una longitud de 25mm y una métrica M12.

3.4 Fabricación del utillaje.

La fabricación de cada una de las piezas que conforman el utillaje ha sido llevada a cabo por la empresa Mecanizados Mafex, S.L. (Sevilla, España) a partir de los planos realizados de cada una de ellas, y disponibles en el anexo de este documento.

En la Tabla 3 podemos ver la cantidad de piezas fabricadas de cada uno de los tipos y los materiales utilizados para su fabricación.

Tabla 3. Cantidades y materiales empleados en la fabricación del utillaje.

	Soporte Inferior	Apoyos	Pieza para aplicar fuerza
Cantidad	1	2	1
Material	Aluminio	Aluminio	Acero Inoxidable

Para la fabricación del soporte inferior y de los apoyos se ha utilizado aluminio para reducir el coste de fabricación. Sin embargo, para la pieza superior que aplica carga al hueso, debido a la presencia de una zona roscada, se seleccionó el acero inoxidable por su mayor resistencia y durabilidad.

En la Figura 21 podemos ver el utillaje fabricado.



Figura 21. Utillaje fabricado.

4 VALIDACIÓN DEL PROTOTIPO

En este capítulo se explicará cómo se ha validado el utillaje fabricado. Para ello se ha tomado de referencia el artículo disponible en la bibliografía [18].

La validación del utillaje ha consistido en ensayar tanto un fémur como una tibia de rata Wistar hembra. En la Figura 22, la imagen (A) muestra cómo se ha colocado el fémur en el soporte, mientras que en la imagen (B) podemos ver como se colocó en el ensayo que se realizó según el estudio de referencia.

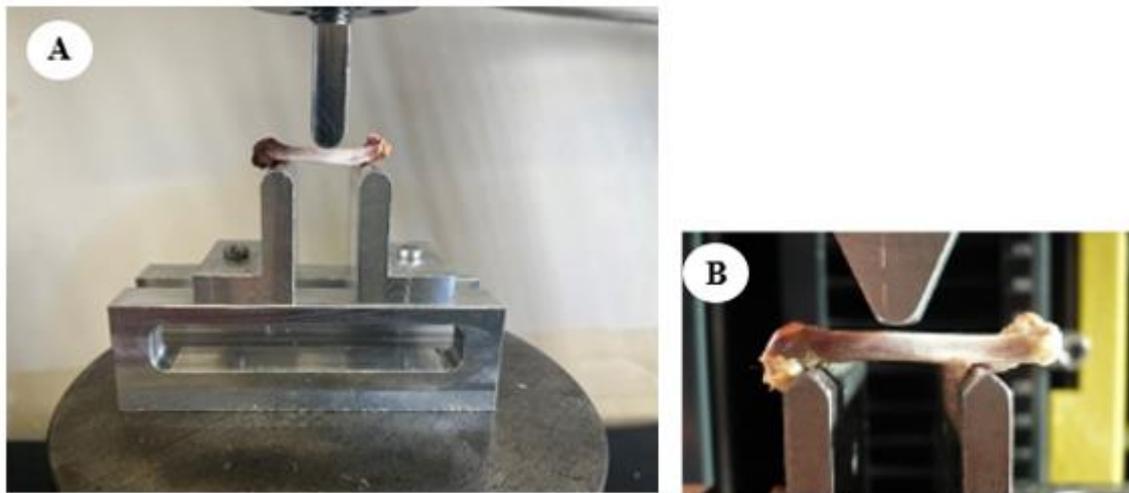


Figura 22. Colocación del fémur para ser ensayado. (A) Validación en el laboratorio, (B) Colocación de la muestra en Prodinger [18].

La colocación (orientación) del hueso influye en los resultados, porque la sección de cortical no es uniforme. En la figura 23 podemos ver una imagen de la sección cortical del hueso con una flecha que indica la dirección en la que se aplica la fuerza.

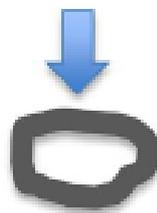


Figura 23. Dirección de aplicación de la carga sobre la sección cortical del fémur [18].

Una vez colocada la muestra, se le aplicó una carga con la máquina de tracción-compresión ensayos 858 MTS Minibionix (MTS Systems, Minnesota, Estados Unidos) con una velocidad constante de 5 mm/min hasta alcanzar la rotura, quedando la muestra como vemos en la Figura 24. Las fuerzas fueron registradas por una célula de 5 kN.



Figura 24. Rotura del fémur.

Durante el ensayo, se tomaron registros de tiempo (s), carga (N) y desplazamiento (mm) a una frecuencia de adquisición de 9.77 ms. A partir de estos datos, obtenemos las gráficas de fuerza-desplazamiento que se muestran en la Figura 25. Estas gráficas nos permiten realizar un análisis de los datos recogidos, pudiendo calcular los parámetros que aparecen en la Tabla 4, que nos servirán para comparar nuestros resultados con los obtenidos, no solo en el artículo de referencia sino también con otros estudios que han utilizado las mismas muestras y métodos de ensayo.

En la Figura 25 podemos ver las curvas de fuerza-desplazamiento generadas a partir de los datos recogidos durante los ensayos. Ambas curvas tienen formas muy diferentes, lo que da lugar a que los parámetros calculados a partir de las mismas también lo sean (Tabla 4). En ambos tipos de huesos tenemos un incremento del desplazamiento con la fuerza aplicada, pero con valores muy diferentes. La rotura del fémur tuvo lugar a valores más altos de fuerza que la de la tibia. Sin embargo, esta presentó claramente un punto de inflexión y una zona post-inflexión (plástica) que no apareció en el fémur.

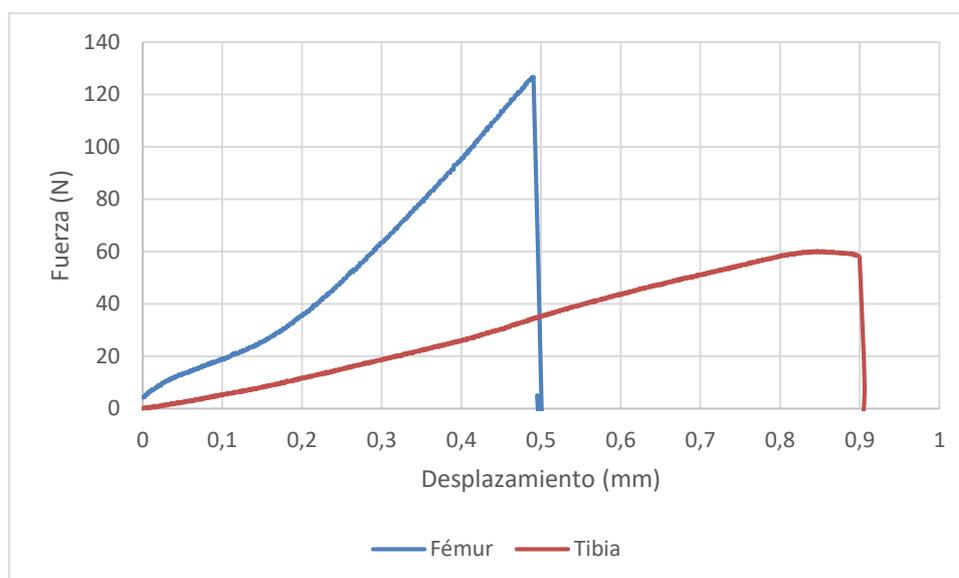


Figura 25. Curva fuerza-desplazamiento obtenida para dos muestras de hueso, fémur (azul) y tibia (rojo), de rata Wistar hembra.

Observando la gráfica correspondiente al fémur podemos ver que este presenta mayor resistencia, ya que alcanza su punto de rotura tras soportar el doble de fuerza que la tibia. El punto de rotura, en el caso del fémur, se da en torno a los 126.81 N, mientras que la tibia rompe alrededor de los 60.12N (Tabla 4). La estimación del módulo de Young presentó valores todavía más diferentes con más del triple en fémur (319.3 N/mm²) que la tibia (80.56 N/mm²).

En ambas gráficas podemos distinguir una zona elástica. Este comportamiento elástico aparece al comienzo del ensayo y se refleja en las gráficas como una tendencia lineal. En el caso del fémur consideremos que la zona elástica comienza a partir de los 20N y finaliza con la rotura de la muestra. Por otro lado, en el caso de la tibia encontramos este comportamiento desde el inicio del ensayo y, a diferencia del fémur, no termina con su rotura, sino que lo hace una vez la muestra ha sufrido un desplazamiento de 0.8 mm aproximadamente, alcanzando el punto de inflexión. Comparando la energía de la zona elástica de ambas gráficas vemos que, tanto en el caso del fémur como en el de la tibia, se alcanzan valores cercanos a los 25 N*mm.

En el caso de la tibia también apreciamos una zona plástica, que aparece tras el punto de inflexión descrito anteriormente. Esta zona es mucho más breve que la elástica y termina con la rotura del hueso, comprendiendo así desde los 0.8mm de desplazamiento hasta los 0.9mm. Este comportamiento no se dio en el caso del fémur.

Tabla 4. Parámetros de las curvas fuerza-desplazamiento. Fuerza en el punto de inflexión, F inflex (N); Fuerza en el punto de rotura, F rotura (N); Módulo de Young (N/mm²); Desplazamiento zona plástica, Desp Plástico (mm); Energía zona elástica, E. elástico (N*mm).

	F. Inflex (N)	F. Rotura (N)	Módulo Young (N/mm ²)	Desp Plástico (mm)	E. Elástica (N*mm)	E. Plástica (N*mm)
Fémur	126.81	126.81	319.3	0	26.75	0
Tibia	60.12	57.91	80.56	0.053	24.79	3.13

Los parámetros representados en la Tabla 4 se han obtenido a partir de las curvas de fuerza-desplazamiento de la siguiente manera:

- **La Fuerza de rotura (N)** fue aquella fuerza obtenida antes del inicio de la caída en vertical.
- **La Fuerza en el punto de inflexión (N)** coincidió con la de rotura en el caso del fémur. En el caso de la tibia, se usó el punto de fuerza máximo a partir del cual las variaciones en fuerza fueron mínima y ligeramente decrecientes, aunque aún se observaba desplazamiento.
- **Desplazamiento plástico (mm)**. En el caso del fémur no existió. En el caso de la tibia el desplazamiento desde el punto de inflexión al de rotura.
- **La energía en las zonas elástica y plástica (N*mm)**. El cálculo en cada zona se determinó según la posición de punto de inflexión. En el caso del fémur no hubo zona plástica. Para cada una de las zonas se estimó la superficie bajo la curva usando una aproximación:

$$E = \sum \left(media(x_i, x_j) * media(y_i, y_j) \right) \quad (1)$$

Donde:

X_i, x_j corresponde al desplazamiento de dos datos consecutivos.

Y_i, y_j corresponde a la fuerza de esos mismos datos consecutivos.

- **Módulo de Young** (N/mm^2). La pendiente de la zona recta antes del punto de inflexión. El inicio de esta zona se estimó aproximadamente a partir del dato de 0.25 mm de desplazamiento. La estimación de la pendiente se hizo a partir de la ecuación de regresión de los datos obtenidos entre ambos puntos.

Haciendo una revisión de los datos disponibles en las distintas fuentes bibliográficas consultadas, podemos ver que existe una gran variabilidad de los resultados en este tipo de ensayo. Incluso dentro del mismo ensayo, podemos encontrarnos variaciones en el resultado debidas a las condiciones del experimento, la edad de los animales o su sexo (Tabla 5). En la mayoría de los artículos que se han tomado como referencia para realizar este estudio se utiliza como muestra el fémur de rata Wistar macho, por lo que principalmente se compararán los resultados obtenidos en el caso del fémur, a pesar de tratarse del sexo opuesto al que se ha ensayado en este trabajo. También se comentarán las similitudes encontradas en el caso de la tibia.

En referencia al fémur, el único valor encontrado de fuerza en el punto de inflexión [44] fue superior al medido, estando este primero entre 175-182 N mientras que, en nuestro caso, este punto coincide con el punto de rotura, que se registra alrededor de los 126.81 N, Tabla 4. Las diferencias son casi de un 40% pero podría estar relacionado con la diferencia de sexo de las muestras. Por el contrario, el valor del punto de rotura estuvo en el intervalo del experimento de Chen et al [49], entre 113 a 139 N, que empleó ratas hembras. Aunque también es similar al descrito por Santos et al [16], en el que se utilizan ratas macho, e inferior de nuevo, al de Huang et al [44].

En el caso de la tibia, por el contrario, la fuerza de rotura (57.91 N) fue inferior a los valores encontrados en la bibliografía (Tabla 5). Aunque hay una gran variabilidad de nuevo, los valores mínimos están entre los 80 N de Honda et al [14] hasta los 89N de Prodinger et al [18]. En ninguno de los dos trabajos hay tibias de ratas hembras por lo que esta diferencia, casi de 40%, podría justificarse por diferencias en el sexo de los animales.

Las mayores variaciones se encuentran en los valores de Módulo de Young. Algunos experimentos tuvieron valores cercanos en Fémur entre 280-358 N/mm^2 [18, 49] que incluirían el valor medido de 319.3 N/mm^2 . Sin embargo, los de la tibia (80.56 N/mm^2) fueron mucho más inferiores, siendo 120 N/mm^2 [18] el valor más bajo encontrado en la bibliografía. No obstante, este dato es con diferencia el que mayor variabilidad presentó entre los trabajos consultados, con valores para el fémur, por ejemplo, entre 45-110 N/mm^2 de Santos et al [16] hasta los 440-486 N/mm^2 de Huang et al [44].

Únicamente se han encontrado datos en la bibliografía sobre el cálculo de las energías elástica y plástica referidas al fémur. En el caso de la energía elástica, en nuestro ensayo obtuvimos un valor de 26.75 $\text{N}\cdot\text{mm}$, dato que es ligeramente inferior al que aparece en Chen et al [49], sin embargo, si comparamos este valor con los que figuran en los artículos Huang et al [44] y Leppänen et al [43] podemos ver que el obtenido durante nuestro ensayo es prácticamente la mitad. Esto podría deberse a que en estos dos últimos artículos se han utilizado ratas macho. Con respecto al calculo de la energía plástica, solo se han encontrado datos en el artículo de Huang et al [44], lo que implica que durante el desarrollo del ensayo el fémur experimentó un comportamiento plástico, sin embargo, en nuestro caso no fue así ya que pasamos directamente de la zona elástica a la rotura. Por esta razón no disponemos de datos experimentales que podamos comparar con los resultados obtenidos en este artículo.

Tabla 5. Resumen de parámetros obtenidos en varios tipos de hueso de diferentes experimentos usando el método de flexión en tres puntos. Fuerza en el punto de inflexión, F inflex (N); Fuerza en el punto de rotura, F rotura (N); Modulo de Young (N/mm^2); Energía zona elástica, E. elástico ($N*mm$); Energía zona plástica, E. plástica ($N*mm$).

Hueso	F. Inflex (N)	F rotura (N)	Módulo Young (N/mm^2)	E. Elástica ($N*mm$)	E. Plástica ($N*mm$)	Referencia
Fémur hembra	126.81	126.81	319.3	26.75	0	Resultados del ensayo realizado
Tibia hembra	60.12	57.91	80.56	24.79	3.13	Resultados del ensayo realizado
Fémur macho	175-182	178-187	440-486	44-46	5-22	[44]
Fémur hembra		113-139	280-316	36-50		[49]
Fémur macho		102-169	45-110			[16]
Fémur macho			347-388			[48]
Fémur macho		138-221	280-358			[18]
Fémur		127-157	161-230	56-72		[43]
Tibia		80-110				[14]
Tibia macho		89-150	120-172			[18]
Húmero macho		90-166	213-317			[18]

5 CONCLUSIONES

El tejido óseo es muy variable en cuanto a su composición. El desarrollo y evolución de los huesos está muy influenciado por las tensiones a las que están sometidos (tipo e intensidad) y por otros factores como posibles patologías que va a afectar a su composición y, por lo tanto, a sus propiedades biomecánicas.

Los tipos de ensayos que se pueden efectuar en los estudios de biomecánica del tejido óseo son, principalmente, de tracción, de compresión y de flexión. Cada hueso está sometido a diferentes tipos de esfuerzos. Conocer qué esfuerzo soporta cada uno de ellos es fundamental a la hora de decidir el tipo de ensayo al que vamos a someter nuestra muestra. Uno de los más habituales es el test de flexión en tres puntos.

A partir de la realización del ensayo de flexión en tres puntos podemos obtener las curvas de fuerza-desplazamiento que nos permiten caracterizar diferentes variables biomecánicas, tales como: el punto de inflexión, punto de rotura, Módulo de Young y energía elástica y plástica. Estas variables nos ofrecen información sobre las propiedades biomecánicas del hueso, sin embargo, estas propiedades no vienen descritas únicamente por los parámetros mencionados, sino que también influye la longitud y el grosor del hueso además del sexo del espécimen del que se ha extraído la muestra.

Las conclusiones que extraemos de nuestro trabajo son:

- El utillaje desarrollado nos ofrece las siguientes ventajas:
 - o Permite realizar ensayos de flexión en tres puntos en un amplio rango de longitudes y grosores de hueso de animales pequeños, lo que dota a nuestro diseño de una versatilidad elevada. En el caso concreto de las ratas Wistar podemos ensayar húmeros, tibias y fémur, siendo estos dos últimos los más empleados en la bibliografía. También somos capaces de ensayar huesos de especies de un tamaño algo superior como el conejo, concretamente tibia y fémures. El uso en especies de mayor tamaño como ovejas u homínidos teóricamente no sería adecuado ya que exceden las longitudes previstas, sin embargo, podrían ensayarse secciones de hueso siempre y cuando la distancia entre los apoyos sea inferior o igual a 50mm. Con todo esto podemos ver que el utillaje no sólo nos permite ensayar diferentes tipos de huesos, sino que también podemos trabajar con diferentes especies.
 - o Permite conocer y estudiar las propiedades biomecánicas del hueso a partir de las curvas de fuerza-desplazamiento obtenidas tras los ensayos.
 - o Una de las principales ventajas que nos ofrece el utillaje desarrollado es que puede ser empleado en todo tipo de ensayos *in vivo* y *ex vivo* en los que la flexión sea un esfuerzo de importancia a la hora de estudiar el tejido óseo: estudios clínicos sobre el efecto del ejercicio físico, sobre la ingesta de sustancias o hábitos alimenticios, efectos de malnutrición u obesidad, evolución por efecto de la edad o el estado hormonal, o tratamientos de medicamentos. Sería necesario complementar estos estudios con estudios de tensión en aquellos huesos en los que la fuerza de flexión no sea, en la naturaleza, la más importante.
- La validación del utillaje con medidas experimentales sugiere que el diseño empleado es adecuado ya que:
 - o Las fuerzas de rotura encontradas están en un rango similar al de la bibliografía en el caso del fémur, pero no en el de la tibia. En el caso de la tibia las diferencias llegaron a ser del 40% respecto a las referenciadas. Aunque estas diferencias son muy

significativas, hay que tener en cuenta que el uso de material biológico hace que la variabilidad en los resultados obtenidos pueda ser elevada. Estas fuentes de error pueden ser muy diversas, las diferencias podrían estar relacionadas con el sexo de los animales empleados, por ejemplo, el fémur de rata macho tuvo una fuerza de rotura alrededor de un 40% mayor que el de una rata hembra (Huang et al [44] vs Chen et al [49]). Los tratamientos a los que están sometidos los especímenes también dan lugar a variaciones, por lo que los datos de la bibliografía no serían completamente comparables ya que podrían estar alterados por efectos de la crianza o el manejo de los animales. Por último, otro aspecto que afecta a los resultados es la dirección de aplicación de la fuerza, ya que el hueso no es homogéneo.

- Los valores del Módulo de Young fueron también similares a los trabajos publicados en fémur, pero menores en tibia, de nuevo. No obstante, la bibliografía consultada presentó en este parámetro una gran variabilidad, lo que hace suponer que esta variabilidad no se debe a fallos de diseño.
- La energía elástica presentó valores similares en fémur en el único trabajo de ratas hembras encontrado en la bibliografía [44].
- Es importante destacar que la prueba experimental fue capaz de mostrar una zona plástica en tibia, lo que sugiere un grado de precisión adecuado, ya que esta zona habitualmente no aparece o, si lo hace, es con un periodo de deformación corto, como por ejemplo en el caso de Proding [18].
- Evaluando todos los puntos anteriores podemos ver que los valores de los parámetros medidos durante el ensayo se encuentran en rangos similares a los encontrados en la bibliografía, por lo que podemos considerar que el utillaje desarrollado es válido y útil para realizar estudios biomecánicos de diferentes tejidos óseos.

5.1 Futuras líneas de trabajo.

Sobre la línea de trabajo seguida durante todo el proyecto podrían realizarse numerosas mejoras, lo que abre nuevas líneas de trabajo. A continuación, se enumeran algunas de las propuestas:

- Una de las mejoras más inmediatas sería realizar este mismo estudio con un número de muestras más elevado que contemple diferentes especies de animales y sexos. De esta manera podemos asegurar que las desviaciones obtenidas en los resultados obtenidos se deben a la variabilidad natural y no a fallos de diseño del utillaje.
- Otra línea interesante de trabajo podría ser explorar el ensayo de secciones de hueso de animales de mayor tamaño, comparando, al igual que se ha hecho en el presente trabajo, los resultados obtenidos en los ensayos con los disponibles en la bibliografía.
- Por último, también podría resultar de interés diseñar una pieza que utilicemos para aplicar la carga, pero con una terminación diferente a la que se ha optado en este trabajo. En la bibliografía, a pesar de ser esta terminación la más común, existen otros tipos que podrían servir para realizar este ensayo. Sería interesante estudiar más concretamente qué utilidad tienen las diferentes terminaciones existentes y la diferencia de resultados que podemos encontrar en función del tipo que se utilice.

REFERENCIAS

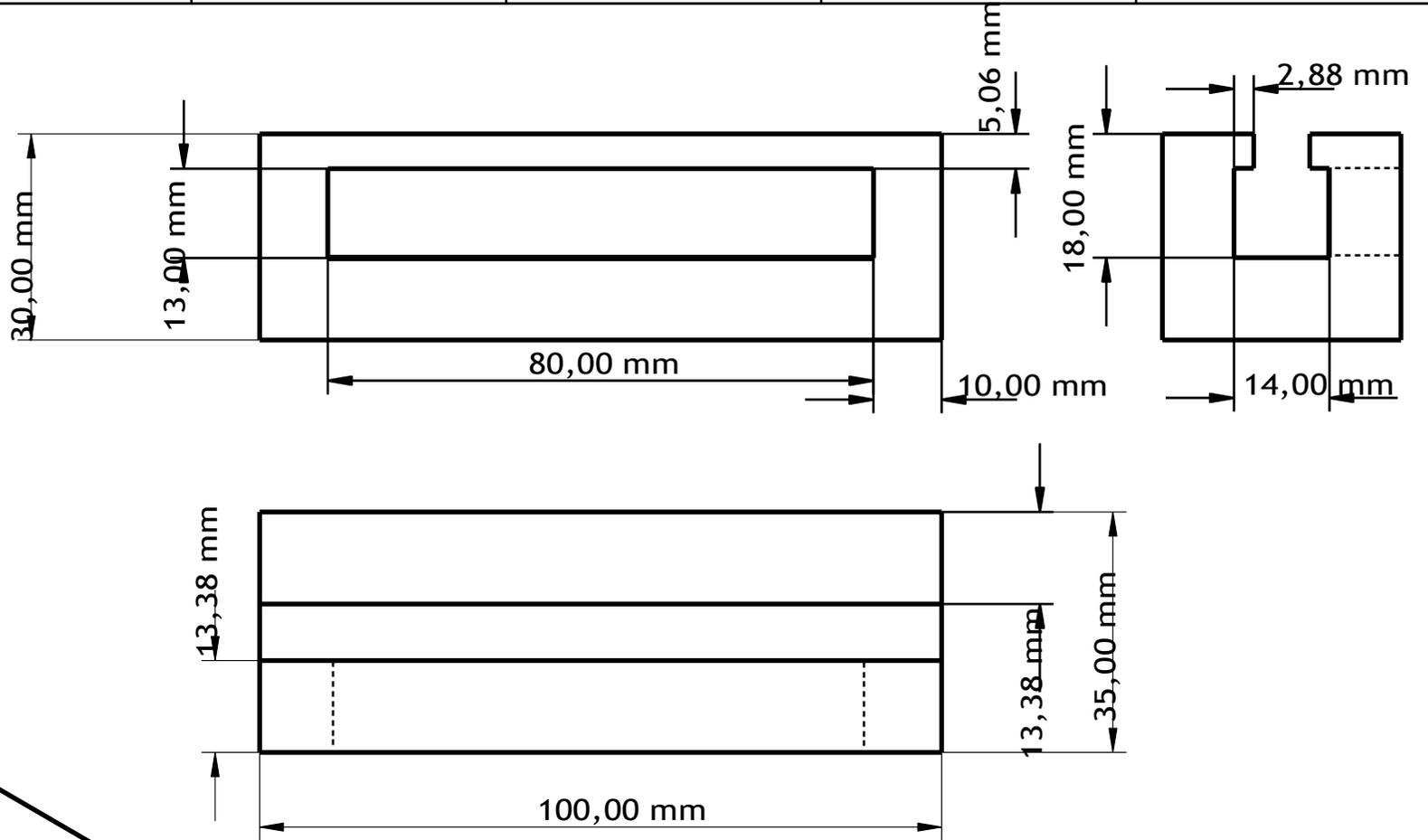
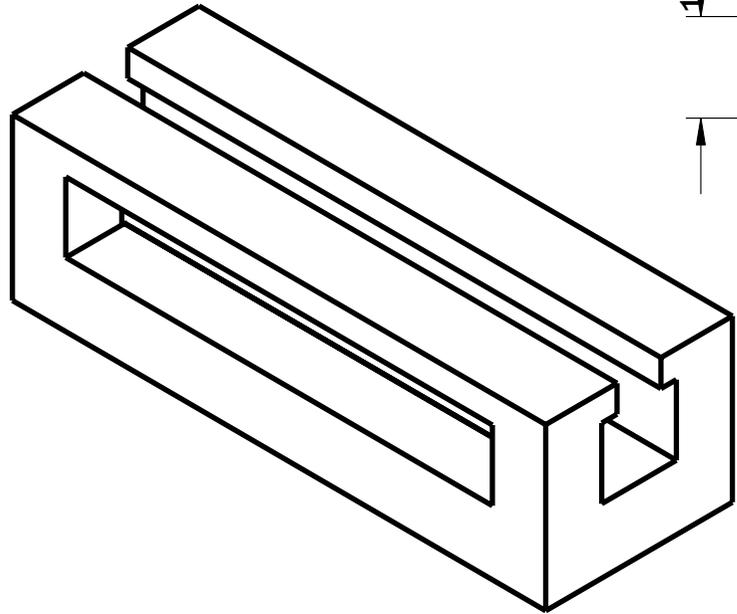
- [1] Y. Fung, «Biomechanics: its scope, history and some problems of continuum mechanism in physiology,» *Applied mechanics reviews*, vol. 21, pp. 1-20, 1968.
- [2] M. Gutierrez-Davila, *Biomecánica deportiva: bases para el análisis*, Madrid: Síntesis, 1999.
- [3] M. Izquierdo Redin, *Biomecánica y bases neuromusculares de la actividad física y el deporte*, Panamericana, 2008.
- [4] D. Winter, «Biomechanics as an Interdiscipline,» de *Biomechanics and Motor control of human movements*, Wiley, 2009, pp. 1-13.
- [5] Sociedad Española de Geriátría y Gerontología, «SEGG,» 10 Febrero 2022. [En línea]. Available: <https://www.segg.es/media/descargas/Osteoporosis-en-Espa%C3%B1a.Feb.2022.pdf>.
- [6] R. y. K. S. Skeel, de *Manual de quimioterapia del cáncer*, Barcelona, Lippincott Williams & Wilkins, 2012, pp. 324-336.
- [7] Sociedad española de oncología médica, «SEON,» 2022. [En línea]. Available: https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf.
- [8] L. Brenes-Coto, «Osteogénesis imperfecta,» *Crónicas científicas*, vol. 10, pp. 16-21, 2018.
- [9] A. Nazarian, F. Ariza-Arroyo, C. Rosso, S. Aran y B. Snyder, «Tensile properties of rat femoral bone as functions of bone volume fraction, apparent density and volumetric bone mineral density,» *J Biomech*, vol. 13, pp. 2482-2488, 2011.
- [10] J. G.-F. P. P. A. M. P. D. J. R.-R. E. Mora-Macias, «Elastic Modulus of Woven Bone: Correlation with Evolution of Porosity and X-ray Greyscale,» *Annals of biomedical Engineering*, vol. 49, pp. 180-190, 2021.
- [11] J. G.-R. J. M.-M. J. D. J. R.-R. E. Martínez-Reina, «Comparison of the volumetric composition of lamellar bone and the woven bone of calluses,» *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine*, vol. 232, nº 7, pp. 682-689, 2018.
- [12] P. M.-M. J. M. J. F.-S. J. D. J. R.-R. E. Blázquez-Carmona, «Mechanobiology of Bone Consolidation During Distraction Osteogenesis: Bone Lengthening Vs Bone Transport,» *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 49, nº 4, pp. 1209-1221, 2021.
- [13] P. S.-H. J. M.-V. F. D. J. R.-R. E. Blázquez-Carmona, «Structural optimization of 3D-printed patient-specific ceramic scaffolds for in vivo bone regeneration in load-bearing defects,» *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 121, 2021.
- [14] A. Honda, Y. Umemura y S. Nagasawa, «Effect of high-impact and low-repetition training on bones in ovariectomized rats,» *Journal of bone and mineral research*, vol. 16, nº 9, pp. 1688-1693, 2001.
- [15] H. Fonseca, D. Moreira-Gonçalves, J. Soares-Esteves, N. Viriato, M. Vaz, M. Mota y J. Duarte, «Voluntary exercise has long term in vivo protective effect on osteocyte viability and bone strength

- following ovariectomy,» *Calcified Tissue interational*, vol. 88, pp. 443-454, 2011.
- [16] M. Santos, J. Pagani, T. Silva, J. Garcia, M. Romao, G. Fernandez y E. Soares, «Effects of coffee (*Coffea arabica*) consumption on the femoral morphology and biomechanics in rats,» *Journal of Morphological Science*, vol. 1, pp. 42-47, 2014.
- [17] J. M.-M. J. A.-J. J. R.-R. E. D. M. D. J. D. M. Sanz-Herrera, «Data driven computational simulation in bone mechanics,» *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 49, nº 1, pp. 407-419, 2021.
- [18] P. Prodinger, P. Foehr, D. Bürklein, O. Bissinger, H. Pilge, K. Kreutzer, R. von Eisenhart-Rothe y T. Tischer, «Whole bone testing in small animals: systematic characterization of the mechanical properties of different rodent bones available for rat fracture models,» *European Journal of Medical Research*, vol. 23, 2018.
- [19] C. Turner y D. Burr, «Basic biomechanical measurements of bone,» *Tutorial Bone*, vol. 14, pp. 595-608, 1993.
- [20] I. B. A. C. P. Oumghar, «Mechanobiological Behavior of a Pathological Bone,» de *Biomechanics and functional tissue engineering*, 2021, pp. 27-48.
- [21] W. S. A. C. F. R. D. Moudani, «Intelligent predictive osteoporosis system,» *International Journal of computer Applications*, vol. 32, pp. 28-37, 2011.
- [22] J. Wolff, «Concept of the law of bone remodelling,» de *The law of bone remodelling*, Springer, 1986, p. 1.
- [23] P. Hou, H. Zhao, Z. Ma, S. Zhang, J. Li, X. Dong, Y. Sun y Z. Zhu, «Influence of punch radius on elastic modulus of three-point bending test,» *Advances in Mechanical Engineering*, vol. 8, nº 5, pp. 1-8, 2016.
- [24] K. P. N. R. S. M. Saffar, «How does the bone shaft geometry affect its bending properties,» *American Journal of applied sciences*, vol. 6, pp. 463-470, 2009.
- [25] y. B. D. R. Rhoades, *Fisiología médica: fundamentos de la medicina clínica*, Lippincott Williams & Wilkins, 2019.
- [26] U. Welsch, T. Sobotta y T. Delles, *Histología, Médica Panamericana*, 2014.
- [27] Colaboradores de Wikipedia, «Wikipedia,» 15 junio 2023. [En línea]. Available: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Esqueleto_humano&oldid=151854249. [Último acceso: 2023].
- [28] B. G. H. A. K. N. M. Tlili, «Multi-Scale Modeling of Mekanobiological Behavior of bone,» de *Biomechanics and functional tissue engineering*, Londres, IntechOpen, 2020, pp. 3-26.
- [29] J. Hall y M. Hall, «Hormona paritoides, calcitonina, metabolismo del calcio y el fosfato, vitamina D, huesos y dientes,» de *Tratado de fisiología médica*, Elsevier, 2021, pp. 991-1009.
- [30] R. M. M. L. H. Durfee, «Review of Osteosarcoma and Current Management,» *Rheumatology and Therapy*, vol. 3, nº 2, pp. 221-243, 2016.
- [31] G. G. L. C. N. S. C. B. A. Bianchi, «Osteosarcoma,» de *Bone tumors. Recent advances and modern management*, Intechopen, 2021, pp. 391-404.

- [32] M. y. F. C. Lynch, «Biomechanical forces in the skeleton and their relevance to bone metastasis: biology and engineering considerations,» *Advanced Drug Delivery reviews*, Vols. %1 de %270-80, pp. 119-134, 2014.
- [33] G. N. P. L. H. M. R. J. R. Helmlinger, «Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids.,» *Nature Biotechnology*, vol. 15, n° 8, pp. 778-783, 1997.
- [34] Y. y. J. R. Boucher, «Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse,» *Cancer research*, vol. 52, n° 18, pp. 5110-5114, 1992.
- [35] G. A. B. G. D. C. M. F. D. S. K. B. W. R. J. R. C. Pagnotti, «Low magnitude mechanical signals mitigate osteopenia without compromising longevity in an aged murine model of spontaneous granulosa cell ovarian cancer,» *Bone*, vol. 51, n° 3, pp. 570-577, 2012.
- [36] S. G. R. K. M. Phonela, «Osteogenesis imperfecta: an overview.,» *South african orthopaedic journal*, vol. 19, pp. 229-234, 2020.
- [37] W. E. D. A. J. H. I. W. H. B. E. S. R. Nijhuis, «Current concepts in osteogenesis imperfecta: bone structure biomechanic and medical management,» *Journal of children orthopaedics*, vol. 13, pp. 1-11, 2019.
- [38] P. B. A. Z. M. R. C. T. E. S. A. J. C. H. P. J. D. W. H. B. J. W. B. B. D. L. A. M. C. Simm, «Consensus guidelines on the use of bisphosphonate therapy in children and adolescents,» *Journal of pediatric children health*, vol. 54, pp. 223-233, 2018.
- [39] J. Guss, M. Horsfield, F. Fontenelee, T. Sandoval, M. Luna, F. Apoorva, S. Lima, R. Bicalho, A. Singh, R. Ley, M. van der Meulen, S. Goldring y C. Hernandez, «Alterations to the gut microbiome impair bone strength and tissue material properties,» *Journal of Bone Mineral Research*, vol. 32, n° 6, pp. 1343-1353, 2017.
- [40] F. O.-T. C. G.-V. J. Lajara-Marcos, «Fracturas: concepto, proceso de consolidación. Inertos y sustitutos óseos,» de *Cirugía ortopédica y traumatología*, Panamericana, 2021, pp. 119-130.
- [41] J. Ferretti, R. Capozza y J. Zanchetta, «Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength,» *Bone*, vol. 18, pp. 97-102, 1996.
- [42] L. Tjäderhane L y Markku, «A high sucrose diet decrease the mechanical strength of bones in growing rats,» *Journal of nutrition*, vol. 128, pp. 1807-1810, 1998.
- [43] O. Leppänen, H. Sievänen, J. Jokihaara, I. Pajamäki y T. Järvinen, «Three point bending of rat femur in the medio lateral direction: introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol,» *American society for bone mineral research*, vol. 21, pp. 1231-1237, 2006.
- [44] T. Huang, F. Chang, S. Lin, S. Liu, S. Hsieh y R. Yang, «Endurance treadmill running training benefits the biometrial quality of bone in growing male wistar rats,» *Journal of bone mineral metabolic*, vol. 26, pp. 350-357, 2008.
- [45] J. McGovern, M. Griffin y D. Hutmacher, «Animal models for bone tissue engineering and modelling disease,» *Disease Models & mechanics*, vol. 11, n° 4, 2018.
- [46] T. J. M. M. R. H. W. Harrigan, «Limitations of the continuum assumption in cancellous bone,» *Journal of biomechanics*, vol. 21, pp. 269-275, 1988.

- [47] D. S. Y. L. G. J. B. D. J. Kong, «Recent advance in evaluation methods for characterizing mechanical properties of bone,» *Archives of Computational methods in Engineering*, 2019.
- [48] H. y. Z. A. Trebacz, «Three point bending and acoustic emission study of adult rat femora after immobilization and free remobilization,» *Journal of Biomechanics*, vol. 39, pp. 237-245, 2006.
- [49] J. Chen, J. S. Wu, H. Lin y S. W. W. H. S. H. Y. Wu, «Dioscorea improves the morphometrical mechanical properties of bone,» *Journal of science food agriculture*, vol. 88, pp. 2700-2706, 2008.
- [50] N. M. M. P. R. F.-L. J. Guerrero, «Análisis de vigas tubulares de acero estructural sometidas a flexión biaxial mediante la teoría del daño concentrado,» *Rev Int Met Num Cal Dis Ing*, vol. 25, pp. 3-27, 2009.
- [51] D. R. A. K. S. B. J. P. G. P. M. K. D. Singh, «Experimental assessment of biomechanical properties in human male elbow bone suggested to bending and compression loads,» *Journal of applied biomaterials and funcional materials*, vol. 17, 2019.
- [52] C. y. B. D. Turner, «Experimental techniques of bone mechanics,» de *Bone Mechanical handbook*, London, CRC Press, 2001.
- [53] G. Y. J. G. F. C. D. L. N. C. L. M. H. Zhang, «Quantifying the effects of formalin fijation on the mechanical properties of cortical bone using beam theor and optimization methodology with specimen-specific finite element models,» *Journal of the biomechanical engineering*, vol. 138, 2016.
- [54] T. H. C. ., M. C. S. J. J. K. H. D. Nash, «Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits,» *Bone*, vol. 15, pp. 203-208, 1994.
- [55] L. G. G. S. C. J. V. A. B. F. I. M. S. V. A. & S. P. B. F. Osuna, «Influence of bone defect position and span in 3-point bending tests: experimental and finite element analysis,» *Brazilian Oral Research*, vol. 35, 2020.
- [56] J. J. T. G. D. K. J. S. M. B. L. S. S. Handal, «Effect of atorvastating on the cortical bone of corticosteroid treated rabbits,» *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 30, pp. 872-876, 2012.
- [57] Asociación española de normalización, «AENOR,» 2023. [En línea]. Available: www.une.org.

6 ANEXO 1: PLANOS



DESIGNED BY: Helena Moriana		Soporte Inferior		G	—
DATE: 4/04/2023				F	—
SIZE: A4		Material: Aluminio		E	—
				D	—
SCALE	WEIGHT (kg)	DRAWING NUMBER	SHEET	C	—
				B	—
This drawing is our property; it can't be reproduced or communicated without our written consent.				A	—

F

E

D

C

B

A

4

4

3

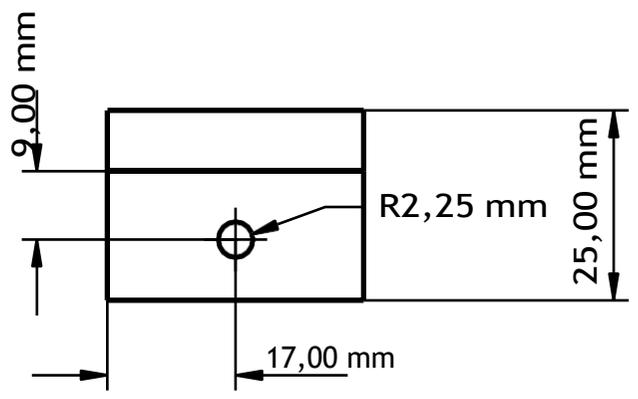
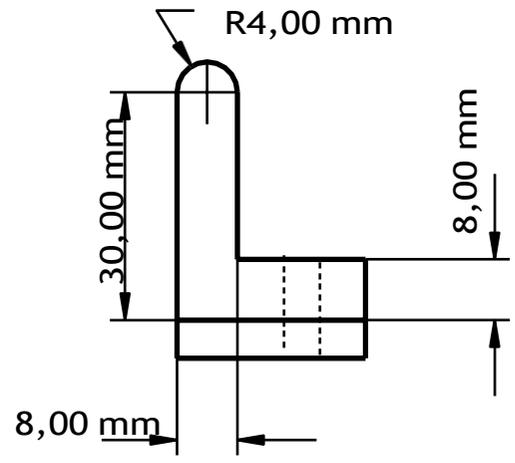
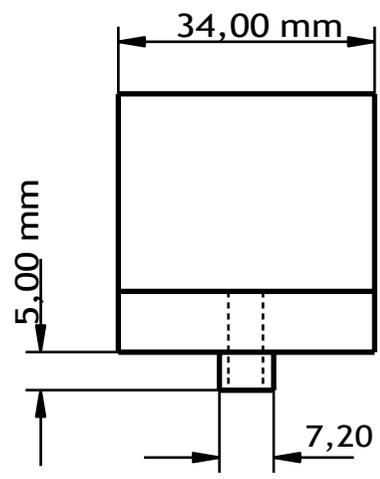
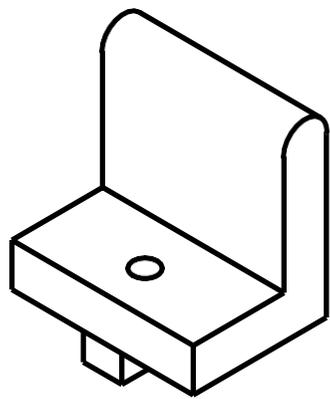
3

2

2

1

1



DESIGNED BY: Helena Moriana		Soporte lateral		G	—
DATE: 4/04/2023				F	—
SIZE A4		Material: Aluminio		E	—
SCALE	WEIGHT (kg)	DRAWING NUMBER		D	—
		SHEET		C	—
				B	—
This drawing is our property; it can't be reproduced or communicated without our written consent.				A	—

F

E

D

F

E

D

C

B

A

4

4

3

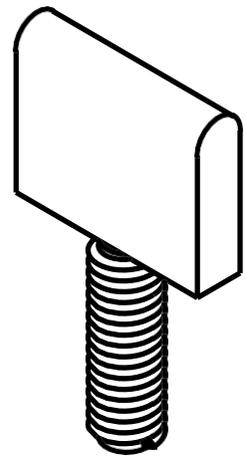
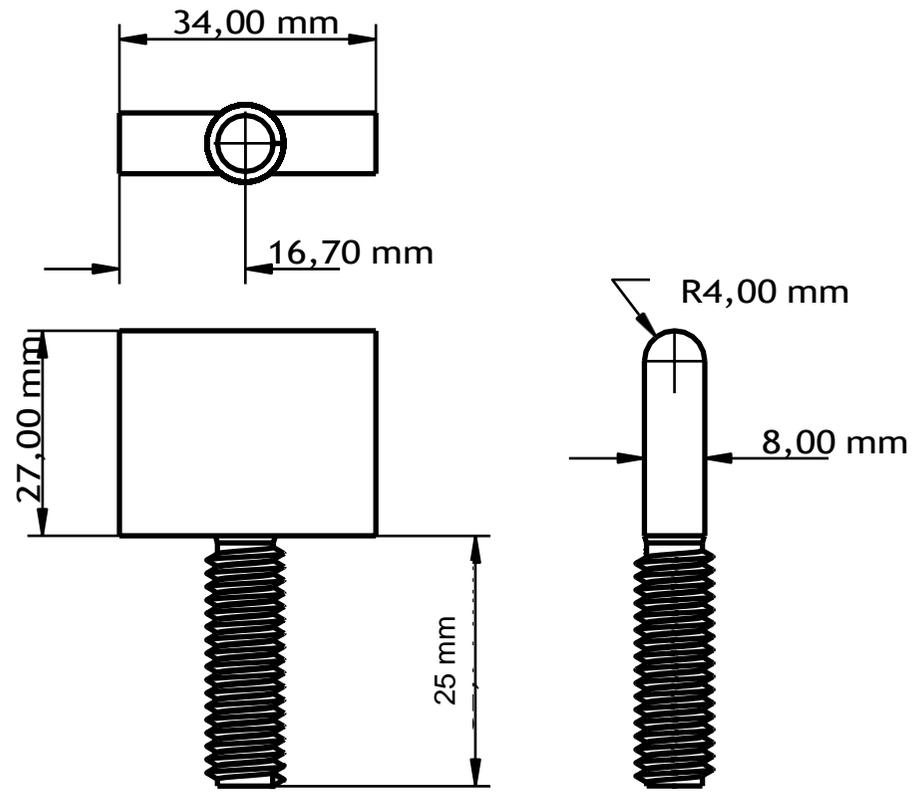
3

2

2

1

1



Rosca con métrica M12

DESIGNED BY: Helena Moriana		Pieza Superior		G	—
DATE: 4/04/2023				F	—
SIZE A4		Material: Acero Inoxidable		E	—
				D	—
SCALE	WEIGHT (kg)	DRAWING NUMBER	SHEET	C	—
				B	—
This drawing is our property; it can't be reproduced or communicated without our written consent.				A	—

F

E

D

C

B

A