

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería de Tecnologías Industriales

Estudio de los cambios geométricos y mecánicos
durante el crecimiento de huesos largos

Autor: Andrés Cano Durán

Tutor: Esther Reina Romo

**Dep. de Ingeniería Mecánica
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla**

Sevilla, 2016



Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería de Tecnologías Industriales

Estudio de los cambios geométricos y mecánicos durante el crecimiento de huesos largos

Autor:

Andrés Cano Durán

Tutor:

Esther Reina Romo

Profesor contratado doctor

Dep. de Ingeniería Mecánica
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla
Sevilla, 2016

Autor: Andrés Cano Durán

Tutor: Esther Reina Romo

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

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2016

El Secretario del Tribunal

A mi familia

A mis maestros

A mis amigos

Agradecimientos

A mi familia, porque sin ellos no podría haber tenido la oportunidad de llegar hasta aquí, ni de poder continuar. Por apoyarme y ampararme siempre.

A mis amigos, por estar siempre ahí para respaldarme y llenarme de buenos momentos cuando más lo he necesitado.

A Esther, Marta, Jorge y Alicia, por ser las personas que más me han ayudado en la realización de este trabajo.

Resumen

En el presente trabajo se han ensayado fémures de rata de diferentes edades, para así evaluar los cambios que se producen en las propiedades mecánicas de los huesos largos con el crecimiento.

Las propiedades mecánicas en los tejidos biológicos se han medido mediante ensayos simples de tracción, compresión y flexión, así como mediante la propagación de ultrasonidos. En muchos casos las técnicas utilizadas entrañan serias dificultades a la hora de tener en cuenta la anisotropía del hueso, así como la variación local de propiedades. Para tratar con huesos largos, se han realizado estudios sobre tibias y fémures, principalmente. El método más utilizado para estos casos ha sido el de ultrasonidos, siendo bastante caro. Por ello, en este trabajo se ha decidido hacer un análisis mediante correlación de imágenes.

Los huesos se han embebido en probetas para poder realizar los ensayos de compresión, y posteriormente se les ha aplicado un patrón estocástico de pintura para poder utilizar la técnica llevada a cabo para el análisis de las deformaciones: videocorrelación en 2D. Este sistema permite el análisis de deformaciones sobre el hueso en tiempo real, y tiene como gran ventaja que es una técnica de medición no invasiva. Una vez finalizados los ensayos, los huesos se han cortado para posteriormente evaluar el área, y de esta forma obtener todos los parámetros necesarios para hallar la rigidez, magnitud principal en la que se basan los resultados obtenidos.

Los valores del módulo elástico recogidos en este trabajo son similares a los obtenidos en anteriores estudios. Asimismo, la desviación típica que se ha producido en los resultados tienen un valor aceptable para la multitud de factores que pueden afectar en éstos.

Índice

Agradecimientos	9
Resumen	11
Índice	13
Índice de Tablas	14
Índice de Gráficas	14
Índice de Figuras	15
1 Objetivos	1
2 Antecedentes	3
2.1 <i>Material óseo</i>	3
2.2 <i>Propiedades mecánicas del hueso</i>	6
2.3 <i>Técnicas de correlación de imágenes digitales</i>	6
3 Materiales y métodos	9
3.1 <i>Animales</i>	9
3.2 <i>Uillaje</i>	10
3.3 <i>Preparación de las muestras</i>	12
3.4 <i>Alineación del hueso</i>	14
3.5 <i>Cálculo del módulo elástico</i>	15
3.6 <i>Ensayos de compresión</i>	17
3.6.1 <i>Ensayo de tipo 1</i>	19
3.6.2 <i>Ensayo de tipo 2</i>	20
3.7 <i>Técnicas de correlación de imágenes digitales</i>	21
3.7.1 <i>Videocorrelación. Vic Snap 2009</i>	23
3.7.2 <i>Videocorrelación. Vic 2D</i>	24
3.8 <i>Evaluación del área</i>	27
3.8.1 <i>Perfect image</i>	28
4 Resultados	29
4.1 <i>Módulo elástico medio y dispersión</i>	29
4.2 <i>Módulo elástico por zona</i>	33
5 Discusión y conclusiones	35
6 Referencias	37
7 Anexos	39
7.1 <i>Valor medio del módulo elástico por posición y grupo</i>	39
7.2 <i>Correlación de imágenes digitales. Modelo</i>	45
7.2.1 <i>Algoritmo de correlación</i>	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión (por zonas). Grupo 1	29
Tabla 2. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión (por zonas). Grupo 2	30
Tabla 3. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión (por zonas). Grupo 3	31
Tabla 4. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión	35

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Fuerza vs. Tiempo. Ensayo de compresión tipo 1	19
Gráfica 2. Fuerza vs. Tiempo. Ensayo de compresión tipo 2	20
Gráfica 3. Módulo elástico medio (GPa) por grupo y zona	32
Gráfica 4. Dispersión por grupo y zona	32
Gráfica 5. Módulo elástico (GPa) por zona. Grupo 1	33
Gráfica 6. Módulo elástico (GPa) por zona. Grupo 2	34
Gráfica 7. Módulo elástico (GPa) por zona. Grupo 3	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona cortical A y trabecular B	4
Figura 2. Diferentes zonas en la estructura de huesos largos	5
Figura 3. Útil de alineamiento	10
Figura 4. Casquillos	11
Figura 5. Zonas de las muestras	11
Figura 6. Muestras grupo 1	12
Figura 7. Muestras grupo 3	12
Figura 8. Resina y endurecedor	13
Figura 9. Disposición de las muestras en el útil	14
Figura 10. Posiciones muestras	15
Figura 11. Definición zonas de estudio	16
Figura 12. Minibionix 858	17
Figura 13. Platos de compresión	18
Figura 14. Programación procedimiento ensayo tipo 1	19
Figura 15. Programación procedimiento ensayo tipo 2	20
Figura 16. Patrón estocástico	21
Figura 17. Correlación de imágenes	22
Figura 18. Descripción de elementos	22
Figura 19. Disposición de elementos. Video-correlación	23
Figura 20. Selección área de interés y seed point	24
Figura 21. Selección de zonas. Cálculo de deformación	25
Figura 22. Montaje para el corte de huesos	27
Figura 23. Montaje para la toma de capturas de evaluación de área transversal	27
Figura 24. Captura Perfect image de área transversal de hueso. Zona proximal	28
Figura 25. Captura Perfect image de área transversal de hueso. Zona distal	28

1 OBJETIVOS

El crecimiento físico en general se define como el aumento en el número y tamaño de las células que componen los diversos tejidos del organismo. En el presente trabajo, se analizará el crecimiento enfocándonos en el tejido óseo. En concreto, se estudiarán los cambios que se producen en las propiedades mecánicas de los huesos largos (fémures) durante la vida de ratas Wistar.

Actualmente las ratas Wistar son una de las cepas más populares y utilizadas cotidianamente para la investigación en el laboratorio, por lo que éste mamífero sirve como un organismo modelo para el análisis de un número importante de características biomédicas y toxicológicas, así como para estudiar la nutrición enteral y parenteral; inclusive es considerado como importante herramienta para la investigación de las condiciones que afectan a los seres humanos y que pueden ser simuladas en ratas.

El propósito principal del trabajo que se desarrollará en lo que sigue es el siguiente:

- Estudiar cómo cambia la rigidez en los fémures de ratas con distintos niveles de crecimiento.

Para llevar a cabo lo que se pretende, aparecen unos objetivos secundarios:

- Evaluar propiedades mecánicas mediante el uso de técnicas de correlación de imágenes digitales.
- Evaluar propiedades geométricas mediante el uso de programas informáticos de tratamiento de imágenes.

2 ANTECEDENTES

En este capítulo se expondrán los estudios que se han realizado anteriormente relacionados con la temática que se trata, es decir, análisis de propiedades mecánicas en huesos con diferentes métodos. A su vez, y como aproximación, se desarrolla una explicación de cómo es el hueso y cómo se comporta para poder comprender el trabajo realizado. Por último, se expone la técnica en la que se basa el presente trabajo: su origen, en qué consiste y sus principales ventajas e inconvenientes.

2.1 Material óseo

El material óseo es muy diferente a cualquier otro tratado por la mecánica clásica. Su estructura es heterogénea y anisótropa; y sus propiedades mecánicas pueden variar mucho, no sólo entre distintos individuos, sino que, para un mismo sujeto, el hueso es capaz de evolucionar modificando sus propiedades dependiendo del tipo de solicitaciones a las que se vea sometido. Es más, ante casos de fracturas los huesos son capaces de regenerarse por sí solos; y por el contrario, debido a enfermedades o envejecimiento, pueden perder propiedades.

A simple vista los huesos parecen estructuras sólidas y de composición homogénea, pero en realidad es un medio poroso bifásico cuyas fases son un armazón rígido, la matriz ósea, y un fluido viscoso (médula ósea). La matriz rígida que componen ambos tipos de tejido óseo está compuesta de capas sucesivas de un espesor que va de 3 a 7 μm denominadas lamelas [14]. A su vez, la matriz ósea se puede presentar en dos configuraciones estructurales: hueso cortical o compacto y hueso trabecular o esponjoso.

Estas dos regiones no difieren en su composición, pero presentan diferencias en su morfología (como se puede visualizar en la *Figura 1*) y comportamiento:

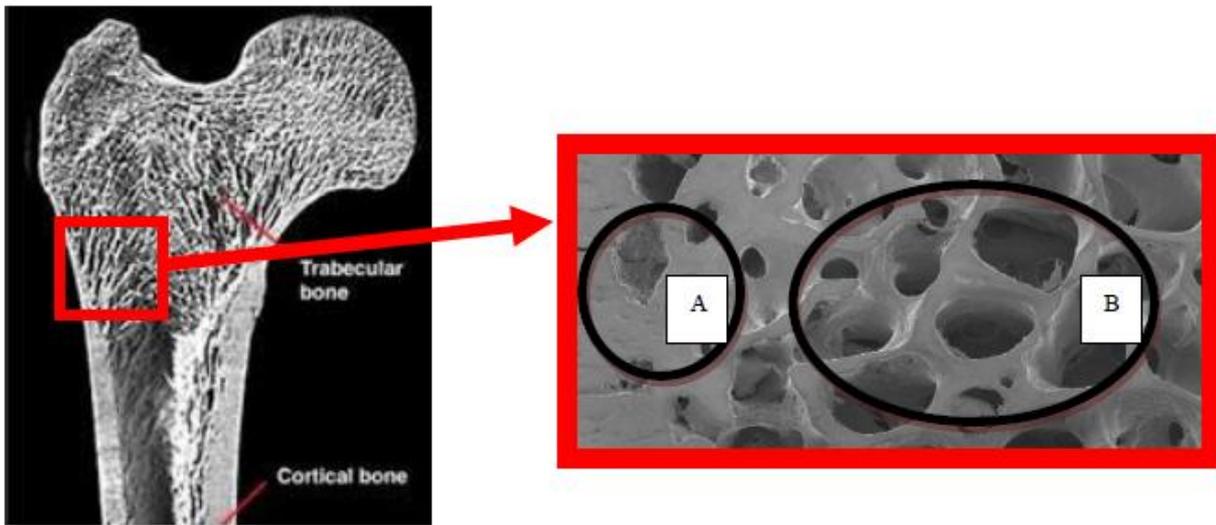


Figura 1. Zona cortical A y trabecular B

El hueso cortical es denso y sólido, también se conoce como compacto, se encuentra sobre todo en el cuerpo de los huesos largos (como es el caso de este estudio) y constituye aproximadamente el 80% del esqueleto. El hueso trabecular o esponjoso constituye el 20% restante del esqueleto, y se encuentra en el interior de los huesos planos (pelvis), en los cuerpos vertebrales y en los extremos de los huesos largos. Por esto, nuestro trabajo se centra principalmente en la zona cortical de hueso, ya que vamos a estudiar la zona central (diáfisis) de los fémures (huesos largos).

La zona esponjosa del hueso es mucho más compleja que la cortical, debido fundamentalmente a la heterogeneidad que presenta. En general, la isotropía de la zona esponjosa del hueso dependerá de los esfuerzos que actúen en cada zona, ya que éstos son los que determinan la simetría geométrica de las trabéculas, entramado de barras y placas que da nombre a esta zona del hueso.

En cuanto a las diferencias estructurales, éstas se explican a través de su función mecánica. El hueso cortical (A) soporta las cargas de flexión y torsión, mientras que el hueso esponjoso (B) absorbe los efectos de cargas repetitivas por medio de las trabéculas.

Los huesos largos como el fémur o la tibia se caracterizan por su forma cilíndrica y están alineados en la dirección de su eje principal. Su estructura tiene tres regiones características, las cuales se presentan a continuación:

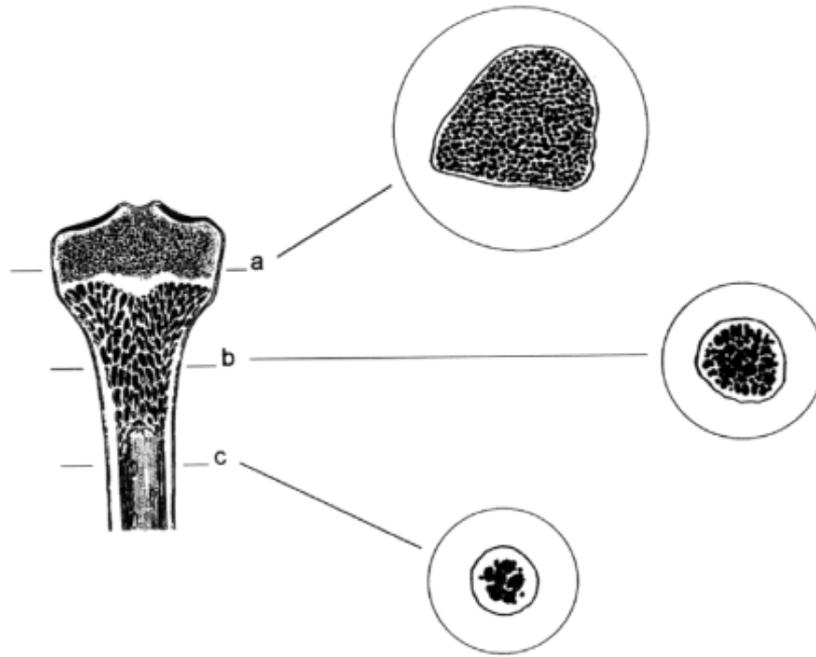


Figura 2. Diferentes zonas en la estructura de huesos largos

a) Epífisis b) Metáfisis c) Diáfisis

- Epífisis: zona de los extremos, la cual está formada principalmente por hueso trabecular recubierto por una fina capa de hueso esponjoso.
- Metáfisis: región que se encuentra entre la epífisis y la diáfisis. Aquí es donde podemos encontrar el cartílago de crecimiento.
- Diáfisis: cilindro de hueso cortical o compacto. La superficie interna recubre la cavidad medular. Esta cavidad está cubierta por el endostio. Externamente la diáfisis está compuesta por el periostio. Esta será la zona a estudiar.

Los fémures, huesos a tratar en este trabajo, están diseñados para trabajar a compresión, que son el tipo de carga que realizaremos en nuestros ensayos. Estas cargas pueden producir alargamiento o acortamiento del hueso, dándose el esfuerzo máximo en el plano perpendicular a la carga, y son muy importantes ya que son necesarias para el desarrollo del hueso. Las tensiones y distensiones producidos por las cargas de compresión son responsables de facilitar la deposición del material óseo, y por tanto, del crecimiento.

2.2 Propiedades mecánicas del hueso

En los últimos años, con el aumento de potencia que han experimentado los ordenadores personales, ha aumentado el número de trabajos en biomecánica en los que se trata de relacionar la estructura del hueso con el estado de carga al que se ve sometido. A partir de ahora nos centraremos en estudios realizados sobre hueso cortical, donde mayoritariamente se han utilizado fémures y tibias de ratas.

Para la determinación de las propiedades mecánicas del hueso se puede aplicar directamente el ensayo de tracción, tomando probetas de distintas zonas del hueso, para determinar la ley tensión-deformación, pero la aplicación del método resulta complicada por la dificultad de conseguir probetas de tamaño adecuado. Para evitar este inconveniente, se han desarrollado distintos dispositivos mecánicos específicos que permiten determinar las propiedades del hueso con una mayor precisión y repetitividad que los métodos convencionales. [1,2]

Algunos autores relacionan el módulo de elasticidad directamente con la microdureza Vickers, más fácil de medir. Es un método sencillo, pero los resultados que se obtienen son muy variables. [3,4]

Las técnicas basadas en ultrasonidos suponen una herramienta muy potente para determinar las propiedades elásticas de sólidos anisótropos, especialmente cuando el tamaño de las muestras que se desean ensayar es demasiado pequeño para ensayos mecánicos, como es el caso del hueso. Como principal desventaja, es un método laborioso y muy caro. [5,6]

Últimamente, con el desarrollo de los métodos numéricos, algunos autores incluso han tratado de simular el comportamiento mecánico del hueso a nivel macroscópico a partir de las características mecánicas de los elementos que constituyen el hueso a nivel microscópico, definiendo modelos que incluyen estos elementos. [7,8].

Para finalizar, comentar que no se ha encontrado en la literatura existente, proyectos donde se haya estudiado cómo afecta el crecimiento a la rigidez de los huesos, es decir, se han analizado propiedades mecánicas sobre huesos de rata, pero sin comparar cómo estas cambian conforme avanza la edad de los animales.

2.3 Técnicas de correlación de imágenes digitales

Uno de los primeros documentos en el que se propuso la utilización de imágenes digitales para obtener las deformaciones fue publicado por Peter y Ranson en 1982. El método consistía en capturar una imagen en el instante inicial y otra tras la realización del ensayo y mediante la comparación de dichas imágenes se obtenía el campo completo de desplazamientos relativos entre el estado inicial y final. Posteriormente, se realizaron numerosas investigaciones en relación al algoritmo de optimización del método. A esta técnica para el cálculo de las deformaciones se le denomina actualmente correlación de imágenes digitales (DIC).

La Correlación Digital de Imágenes (DIC) es una técnica óptica de campo completo que permite la medición de desplazamientos y deformaciones. La técnica consiste en la toma de imágenes digitales durante el ensayo de una probeta desde su estado inicial (considerado como el de referencia) hasta su estado final (deformado).

Entre las características más importantes de la correlación de imágenes digitales (DIC) encontramos las siguientes:

- Es un método no invasivo mediante el cual se puede determinar el campo completo de deformaciones.
- Se pueden realizar ensayos dinámicos.
- El rango de validez es muy amplio.
- Los límites de los desplazamientos son muy elevados.
- No requiere de calibración.

Como contraposición es necesario tener en cuenta que a nivel puntual se obtienen peores resultados que mediante el uso de otros métodos, como por ejemplo las bandas extensométricas.

Esta técnica consiste en la captura de imágenes consecutivas con una cámara digital durante el período de la deformación para evaluar el cambio en las características de la superficie y comprender el comportamiento de la muestra mientras está sujeto a cargas incrementales. Dependiendo si el desplazamiento se produce en el plano o fuera de él, la técnica de correlación de imágenes debe utilizarse en dos o en tres dimensiones. En nuestro caso, al tener una única cámara, consideraremos que la deformación se produce en el plano, por lo tanto trabajamos en 2 dimensiones.

Como proponen Pan et al. [22], esta técnica presenta varias ventajas respecto a otros métodos ópticos interferométricos para la medición de desplazamientos y deformaciones, que ponen de manifiesto el gran interés de la técnica en el campo de la mecánica experimental:

- El montaje es sencillo.
- La luz necesaria para la realización de los ensayos puede ser luz natural, aunque en nuestro caso se ha utilizado una fuente de luz externa para mejorar la calidad de las imágenes.
- Es versátil, no invasiva y llega a tener 0.01 pixel de precisión para la medida de desplazamientos y 0.01% para la medida de deformaciones.
- Los algoritmos que implementa la técnica tienen bajos requerimientos computacionales, pudiendo incluso realizarse análisis en tiempo real.

Igualmente, la técnica presenta algunas desventajas como es la dependencia de la calidad de las imágenes tomadas en los ensayos, y las mediciones de deformaciones donde la superficie presente roturas, ya que conllevan pérdida de información.

Este método ha sido utilizado con anterioridad para la caracterización mecánica de diversos materiales, habiéndose encontrado un estudio donde se analizaban tibias de rata (en nuestro caso serán fémures) [21] y otro donde sí se analizan fémures de rata, pero donde no se tiene en cuenta la edad de estas [16].

3 MATERIALES Y MÉTODOS

La finalidad de este trabajo es caracterizar mecánicamente los fémures de rata de distintas edades, siendo objeto de estudio el comportamiento de hueso cortical o compacto.

En primer lugar, se seleccionaron los animales. Una vez recepcionados habiendo sido sacrificados previamente, se extrajeron los fémures. A continuación, con los huesos ya preparados convenientemente se prepararon unas probetas, cada una de ellas formada por un hueso embebido en resina en dos casquillos. Posteriormente se han pintado las probetas y una vez listas, se le practicaron los ensayos de compresión. Durante estos ensayos se recogieron todos los datos necesarios para los posteriores cálculos realizados. Todo el proceso se explicará detenidamente en este capítulo.

3.1 Animales

Según estudios ya realizados [11], coincidiendo con lo descrito por Enesco, Leblond [12] hace más de 50 años, estos mamíferos presentan un 18,8% de crecimiento a los 21 días de edad, un 50% a los 56 días y un 100% a los 112 días. Por tanto, se pueden distinguir tres fases: la fase inicial denominada hiperplasia, que comprende los primeros 17 días de vida, la fase intermedia (hiperplasia-hipertrofia), que va desde los 17 hasta los 48 días de edad; y la fase final (almacenamiento), que va de los 48 días en adelante. Según estos criterios han sido seleccionados los animales que se estudiarán.

Se han utilizado para este trabajo 40 muestras; es decir, 20 animales (todas hembras) divididos en 4 grupos. El primer grupo se utilizó para practicar y los otros 3 han sido sobre los que se ha realizado todo el proceso de ensayos y análisis de resultados. Los animales han sido proporcionados por el “Servicio general de producción y experimentación animal” de la Universidad de Sevilla. El proceso se organizó de la siguiente forma: una vez preparados los animales y acordado el día, en el mismo animalario se produjo la extracción y clasificación de los fémures, para su posterior disección y preparación de probetas en el laboratorio. Se ha dividido por tandas, es decir que el proceso de adquisición de huesos se realizó en 4 días diferentes.

A continuación, pasan a enumerarse los diferentes grupos de animales utilizados para el estudio (no se detalla el grupo de animales que fueron utilizados para pruebas porque de ellos se han realizado diferentes tipos de ensayos y no se han recogido los resultados). El orden en el que se colocan es el orden cronológico que se ha seguido durante la realización del trabajo: primero se empezaron por las ratas más longevas y se terminó con las más prematuras. Este orden se ha escogido así debido a la mayor dificultad funcional que han supuesto los animales más pequeños, lo cual se explicará posteriormente.

Grupo 1. Ratas nacidas en la semana del 11-17/10/2015 y sacrificadas el 05/05/2016 → 30 semanas (100% de crecimiento)

Grupo 2. Ratas nacidas en la semana del 14-20/03/2016 y sacrificadas el 25/05/2016 → 10 semanas (algo más del 50% de crecimiento)

Grupo 3. Ratas nacidas en la semana del 11-17/04/2015 y sacrificadas el 12/05/2016 → 4 semanas (en torno al 20% de crecimiento)

3.2 Utillaje

Para el alineamiento de las muestras se ha utilizado un útil que fue diseñado para un proyecto similar que se realizó anteriormente [16], el cual hubo que limpiar y desmontar para que volviese a cumplir correctamente sus funciones. El objetivo principal de este instrumento es eliminar en la medida de lo posible la componente a flexión de cara a la realización de los ensayos; es decir, que la aplicación de la carga se lleve a cabo en la vertical, para evitar de este modo efectos de pandeo que pudiesen falsear los resultados.

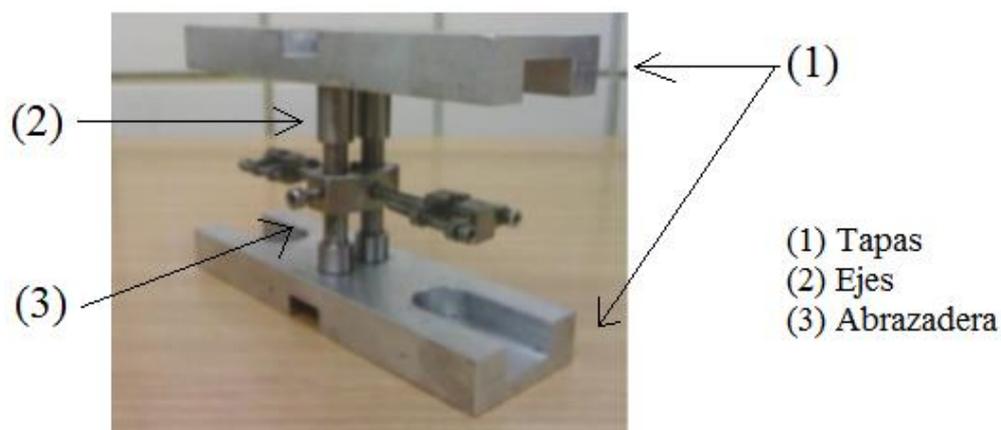


Figura 3. Útil de alineamiento

El útil de alineamiento, como puede verse en la *Figura 3*, está compuesto por dos tapas (1), unos ejes que sirven de guía (2), y una abrazadera (3). Está preparado para albergar dos muestras a la vez (fémur izquierdo y derecho) y es simétrico de tal forma que se puede voltear una vez curada la resina (proceso que se explicará posteriormente), así se manipula lo menos posible la muestra durante la etapa de preparación.

Por otro lado, para embeber las muestras, se han fabricado casquillos de aluminio (con la colaboración del taller de Ingeniería de fabricación de la escuela) de dos tamaños (véase la *Figura 4*). En los grupos 1 y 2, la zona proximal (de mayor tamaño) se introdujo en el casquillo grande y la zona distal (de menor tamaño) en el pequeño. Para el grupo 3, por el menor tamaño de los huesos se utilizaron casquillos grandes en ambas zonas por motivos funcionales.



Figura 4. Casquillos

Como se observa en la *Figura 5*, así quedan los huesos embebidos dentro de los casquillos. El conjunto hueso y casquillos rellenos de resina es lo que denominamos probeta. La zona central es la que presenta una geometría regular con tramos cuasi rectos. Es por ello que esta zona es la que no será embebida para su posterior análisis por videocorrelación.

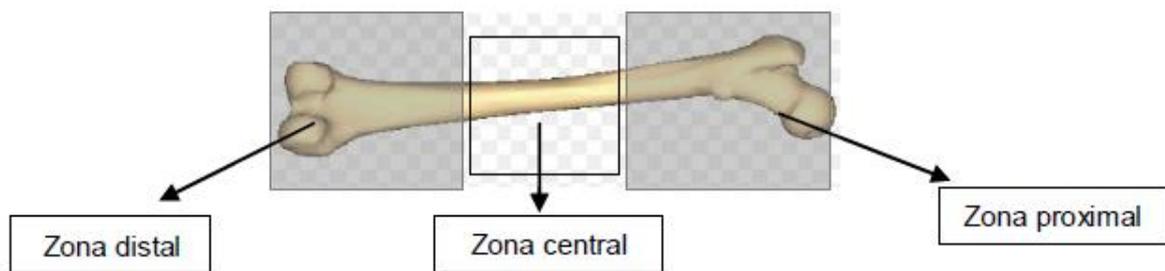


Figura 5. Zonas de las muestras

3.3 Preparación de las muestras

En primer lugar, se extrajeron los fémures de rata en el mismo lugar donde se nos proporcionaron los animales ya sacrificados (Servicio general de producción y experimentación animal). Una vez extraídos y clasificados los huesos, en el laboratorio se le practicó una disección minuciosa con el propósito de eliminar todo el tejido muscular. Posteriormente, para su conservación se han mantenido los huesos en un congelador a -20 °C.

En la ilustración que se muestra a continuación, *Figura 6*, referida a un par de huesos del grupo 1 (los del grupo 2 son de tamaño similar) pueden distinguirse las zonas comentadas en el apartado anterior: central, proximal y distal, y las dos posiciones sobre las que se analizarán las deformaciones según las técnicas de videocorrelación: anterior y posterior. La zona distal corresponde con la inserción del hueso con la rodilla, y la zona proximal corresponde con la inserción de la cadera. En lo que sigue nos centraremos en el estudio de la zona central, teniendo en cuenta que será necesario dividir dicha zona en tres partes como se verá posteriormente en la *Figura 11*.

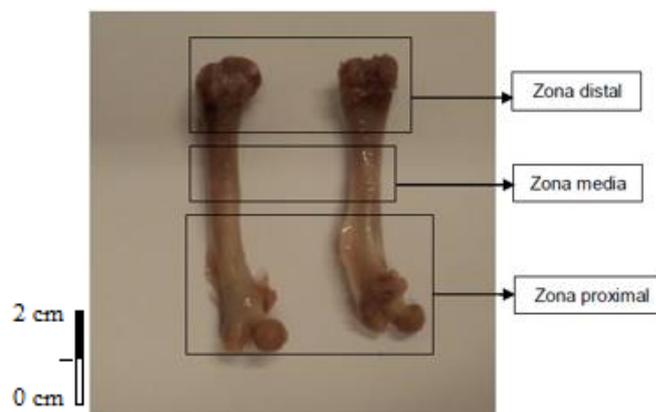


Figura 6. Muestras grupo 1



Figura 7. Muestras grupo 3

En la *Figura 7* (tomada la imagen desde la misma distancia que la *Figura 6*), vemos una muestra del grupo 3 (4 semanas), con la visible reducción de tamaño ya comentada anteriormente.

Para garantizar la fijación de las muestras una vez alineadas, se ha optado por embeberlas en una resina de curado en frío (*EpoFix, Struers*) mezclada con un endurecedor en la siguiente proporción: 15/2 partes por volumen de resina/endurecedor respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las características principales de este tipo de resina son las siguientes:

- Punto de inflamación: 177°C
- Densidad relativa: 1,1
- Solubilidad: < 1% en agua.
- Estabilidad: estable a temperaturas normales.
- Almacenamiento: lugar fresco y seco.
- Tiempo de endurecimiento: 12 horas (aun así, las muestras se han dejado 24 horas).



Figura 8. Resina y endurecedor

Es importante recalcar el elevado tiempo de endurecimiento de la resina, ya que hace que la etapa de preparación de las muestras dure un tiempo considerable, pero se utiliza esta resina porque debido a sus propiedades y los ingredientes que contiene no altera las propiedades mecánicas del hueso, de esta forma podemos llevar a cabo los ensayos necesarios para la realización del estudio que se pretende de forma óptima.

Antes de embeber los huesos en resina, éstos se han dejado secar a temperatura ambiente el tiempo necesario para garantizar una adecuada deshidratación, ya que se han conservado congelados durante un tiempo. Se hace de esta forma para garantizar el objetivo comentado anteriormente y que debemos tener siempre presente: no alterar las propiedades mecánicas del hueso.

Otros autores han realizado los ensayos sobre huesos frescos, obteniéndose resultados que se mostrarán en el capítulo 5: “*Discusión y conclusiones*”. En nuestro caso, por no poder realizar los ensayos inmediatamente después de ser extraídos los huesos, se ha decidido conservarlos congelados y después secarlos.

Como se indicó con anterioridad, para embeber las muestras se utiliza una mezcla de resina y endurecedor con las proporciones recomendadas. En primer lugar, se mezclan durante 2 minutos y después se deja reposar otros 2 minutos, siguiendo siempre las recomendaciones del fabricante. Por último, se vierte la mezcla en los casquillos. Durante este proceso, hay que tener especial atención con un aspecto: la formación de burbujas; la cual debemos evitar por los siguientes motivos:

- Si se forman burbujas internas, a la hora de aplicar una carga de compresión podría llevar a deformarse la resina.
- Si se forman burbujas en la zona de unión de la resina con el hueso, la muestra presentaría una holgura que impediría realizar el ensayo correctamente (la muestra podría flectar).

Para evitar la creación de burbujas se ha tenido especial cuidado al realizar la mezcla de resina y endurecedor, tanto vertiendo ambos ingredientes como mezclándolos después: removiéndolos a mano con la velocidad necesaria para que se mezclasen bien, pero sin que se formasen las indeseadas burbujas. En caso de que apareciesen algunas microburbujas durante el proceso éstas se han eliminado con un palillo fino de madera.

3.4 Alineación del hueso

El correcto alineamiento de las muestras es una etapa crucial de cara a la evaluación de las propiedades mecánicas; ya que será un factor determinante en la correcta aplicación de la fuerza en el ensayo de tracción y la correcta obtención de las deformaciones de la muestra; debido a que al evaluarlas mediante una técnica 2D, lo que ocurra fuera del plano de la muestra no podrá cuantificarse mediante la técnica de video-correlación.

En la *Figura 9* se puede ver la colocación de las muestras en el útil de alineamiento. Se observa como la abrazadera fija la zona central del hueso que es la zona recta, y como quedan al aire la zona distal y proximal. En este caso, la zona proximal es la inferior (cadera) y la zona distal la superior (rodilla).

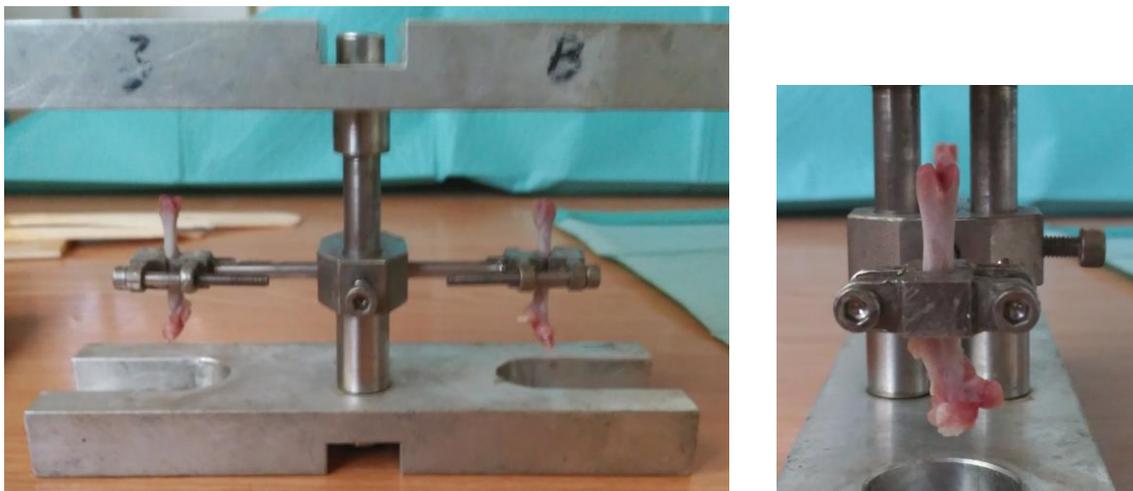


Figura 9. Disposición de las muestras en el útil

Las muestras han sido ensayadas en 2 posiciones diferentes: anterior y posterior, ilustradas en la siguiente imagen:



Figura 10. Posiciones muestras

3.5 Cálculo del módulo elástico

La caracterización mecánica de los fémures se llevará a cabo fundamentalmente a través del siguiente parámetro: el módulo elástico o módulo de Young. A continuación, se expondrá como se define el módulo elástico, y posteriormente se detallará cómo se han ido obteniendo todos los parámetros de los que depende.

El módulo elástico se define como:

$$E = \frac{F}{A \xi} \quad (1)$$

Donde E es el módulo elástico, F es la fuerza aplicada sobre la muestra, A es el área transversal de la misma y ξ es la deformación axial logarítmica a la que se ve sometida.

La *fuerza* aplicada en el ensayo de compresión, F , se obtendrá de los valores proporcionados por la célula de carga de la máquina de ensayo. Será mediante una salida analógica como se obtendrá la fuerza aplicada sobre las muestras en cada uno de los fotogramas.

El *área transversal* de la muestra, A , se obtendrá una vez realizado el ensayo, seccionando los huesos por las zonas deseadas y obteniendo los resultados mediante programas de evaluación de imágenes.

Con el propósito de analizar el comportamiento anisótropo del tejido óseo, y una vez ensayadas las muestras, pasaron a distinguirse tres zonas, ya que como se ha comentado con anterioridad, debido a la anisotropía característica de los especímenes óseos, es necesario evaluar las características mecánicas localmente. Esto se ha llevado a cabo debido a la anisotropía del material y a la influencia de las condiciones de contorno en los resultados obtenidos. En la *Figura 11* se detallan las zonas sobre las cuales se determinará el módulo elástico de las muestras.

- Zona 1: Distal
- Zona 2: Media
- Zona 3: Proximal

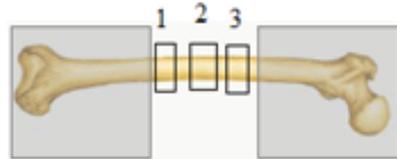


Figura 11. Definición zonas de estudio

El cambio de longitud que sufre un objeto bajo esfuerzo se conoce como *deformación*. Para la evaluación de la deformación a la que se ve sometida la muestra, usaremos técnicas de video-correlación. Una vez hallados la fuerza, el área transversal y la deformación, podemos llegar al valor del módulo elástico.

El software usado para nuestro objetivo utiliza algoritmos de correlación optimizados para proporcionar el desplazamiento y deformación a los que se ven sometidos las probetas durante los ensayos. Éste permite extraer datos de deformación real gracias a la selección del tensor de Hencky como referencia en los cálculos internos del programa.

La deformación axial logarítmica o deformación de Hencky se define como el logaritmo natural de la razón de la longitud inicial a la longitud final, en tracción o en compresión.

$$\xi = \ln \lambda = \ln (1 + e) \quad (2)$$

Donde e hace referencia a la deformación ingenieril:

$$e = \frac{u}{l_0} \quad (3)$$

3.6 Ensayos de compresión

Una vez preparadas las muestras, pasará a realizarse un ensayo de compresión sobre las mismas. Al igual que la preparación de las muestras era diferente para el grupo 3, en el caso de los ensayos nos encontramos con la misma situación: se realiza un ensayo de tipo 1 para los grupos 1 y 2, y un ensayo de tipo 2 para el grupo 3. Los dos tipos de ensayo se explicarán posteriormente. Los ensayos se realizarán de manera simultánea al de video-correlación, ya que se pretende obtener la fuerza y la deformación a la que se ve sometida la probeta, para poder así calcular el módulo elástico como se ha comentado anteriormente.

Durante la ejecución de los ensayos, se ha llevado a cabo un control de las condiciones de temperatura y humedad a través de un medidor digital. Éstos se han realizado en condiciones ambientales, por lo que la temperatura ha estado en el intervalo 20-30 °C y la humedad entre el 35-40%.

Para la realización de dichos ensayos se hará uso de la máquina servohidráulica *MTS Minibionix 858*, *Figura 12*, del laboratorio de Ingeniería Mecánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de la Universidad de Sevilla. Esta máquina está diseñada con características que permiten proporcionar un alto rendimiento a valores bajos de fuerzas, necesarios en el caso de pruebas biomecánicas, al incluir actuadores de muy baja fricción. Es necesario tener en cuenta que la velocidad a la cual la carga se aplica al hueso durante las pruebas biomecánicas afecta a las mediciones de rigidez y resistencia, por lo que la velocidad de desplazamiento del pistón se ha fijado en un valor pequeño y constante con el fin de simular una carga estática, teniendo en cuenta que hay que variar dicha carga de acuerdo a las necesidades de la prueba.

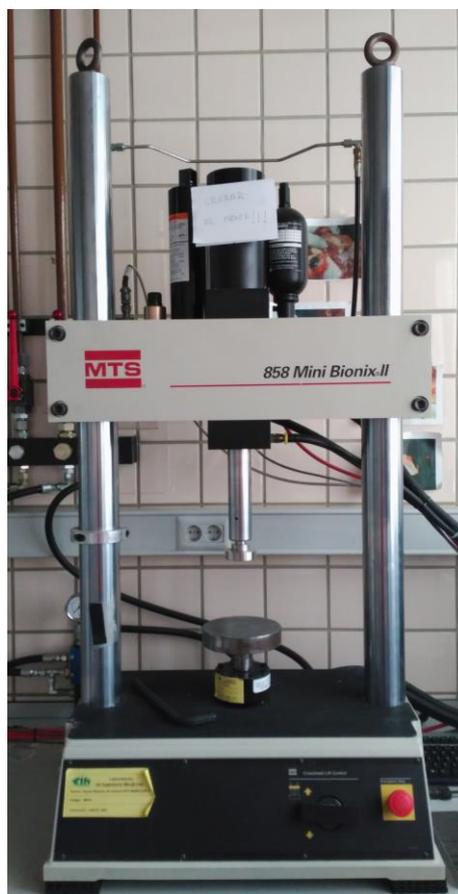


Figura 12. Minibionix 858

En la máquina de ensayo, a modo de mordaza, se disponen un par de platos encargados de realizar la compresión.



Figura 13. Platos de compresión

Por lo que una vez posicionada correctamente la probeta, se aplica sobre ella una pre-compresión aproximadamente del 5% del valor total de fuerza (-10 N para el ensayo de tipo 1, y -2 N para el ensayo de tipo 2) para favorecer el agarre y acomode de la pieza en los platos, y se pasa a poner en marcha los ensayos de compresión. El equipo que se utilizará para la medida de fuerza será una célula de carga de 5kN.

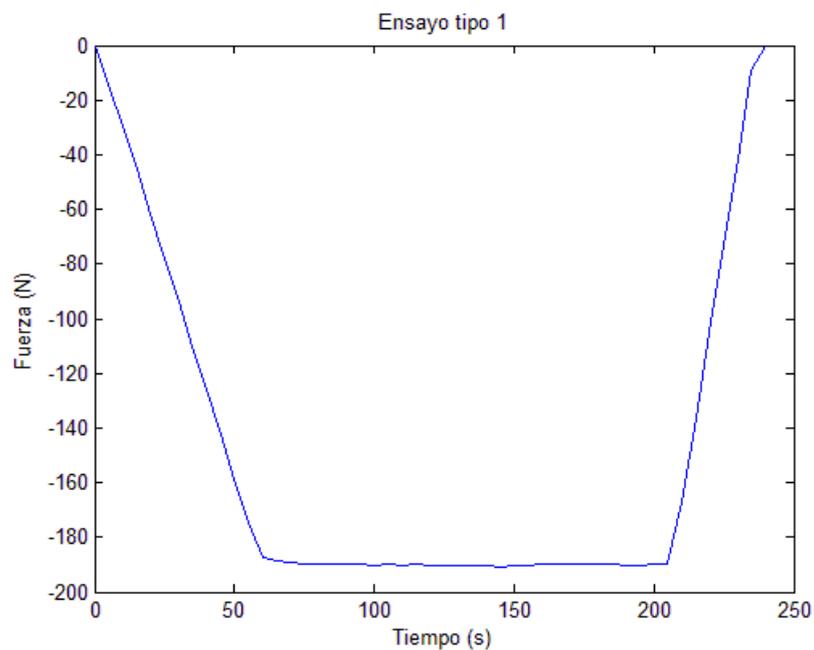
La realización de los ensayos se ha llevado a cabo mediante la programación de un procedimiento (hay 2 tipos de procedimiento, como ya se ha comentado) que se divide en tres partes: una primera parte de carga, posteriormente una parte de carga mantenida, para finalmente llevar a cabo una descarga. Los ensayos se han llevado a cabo con un control en fuerza.

Con la finalidad de garantizar una correcta ejecución del ensayo, de igual manera que se ha programado el procedimiento de ensayo, también se han establecido unos disparos de emergencia que pararán el ensayo en el caso de alcanzar unos valores de fuerza impuestos, con el fin de preservar en todo momento la probeta en el caso de que la máquina tuviese un comportamiento inapropiado.

3.6.1 Ensayo de tipo 1

Este es el ensayo que se ha realizado a los grupos 1 y 2. Sus características principales son las siguientes:

- Zona de carga. Duración: 60s. Valor final de fuerza: -190 N
- Zona de mantenimiento. Duración: 150s (escogida para que tengamos un buen número de capturas realizadas por la cámara para poder analizar posteriormente la deformación)
- Zona de descarga. Duración: 30s



Gráfica 1. Fuerza vs. Tiempo. Ensayo de compresión tipo 1

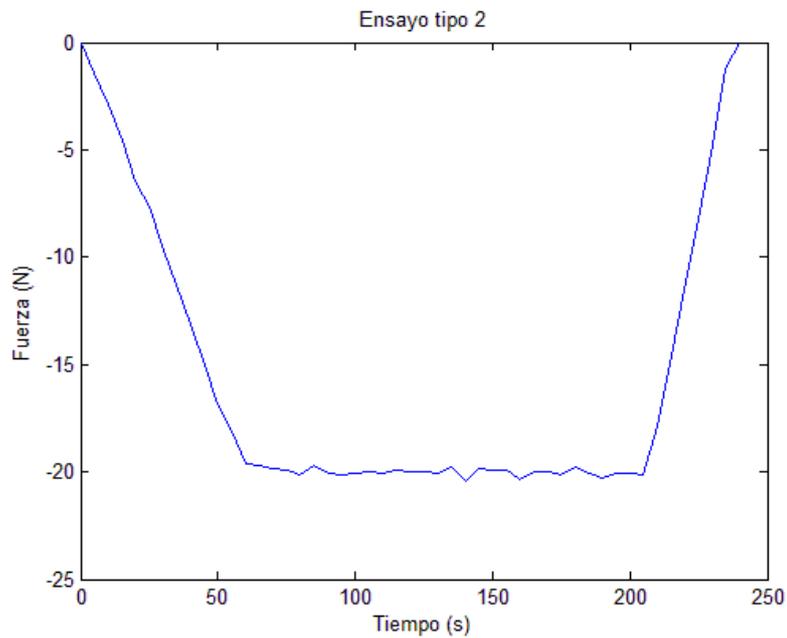


Figura 14. Programación procedimiento ensayo tipo 1

3.6.2 Ensayo de tipo 2

En este apartado se expone el ensayo que se ha realizado al grupo 3. Sus características principales son las siguientes:

- Zona de carga. Duración: 60s. Valor final de fuerza: -20 N (el valor límite es bastante menor que en el caso anterior debido al menor tamaño de los huesos y la necesidad de que estos no se dañen durante los ensayos)
- Zona de mantenimiento. Duración: 150s
- Zona de descarga. Duración: 30s



Gráfica 2. Fuerza vs. Tiempo. Ensayo de compresión tipo 2

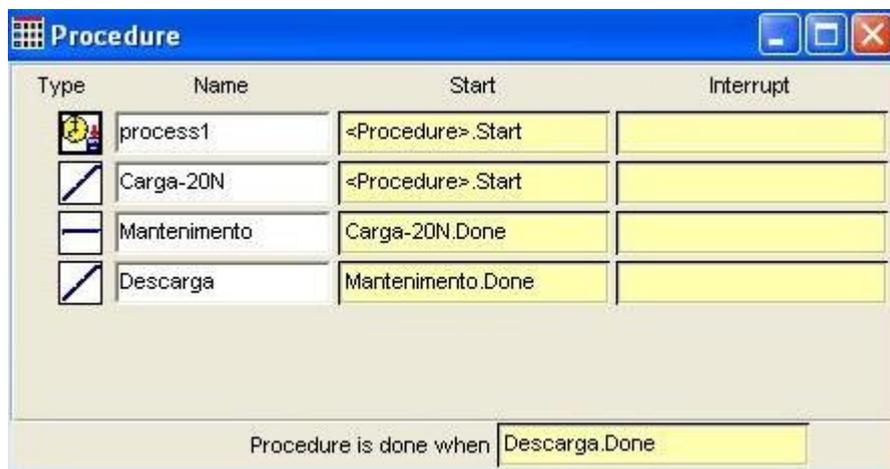


Figura 15. Programación procedimiento ensayo tipo 2

3.7 Técnicas de correlación de imágenes digitales

Para aplicar este método, la muestra tiene que ser preparada mediante la aplicación de un patrón de puntos aleatorios (patrón moteado) en su superficie. El patrón estocástico se consigue aplicando pintura en spray: en primer lugar, una base blanca mate, flexible y adherente; y posteriormente un fino moteado negro que debe ser lo más uniforme posible. Esta uniformidad es necesaria debido a que si aparecen puntos de mayor tamaño que el subconjunto (subset), se deberá aumentar el tamaño del subset para evitar la aparición de errores, pero es necesario tener en cuenta que el trabajar con subset grandes reduce la capacidad de medir gradientes correctamente.

Por otro lado, si el patrón de puntos es demasiado pequeño, la resolución de la cámara puede no ser suficientemente precisa como para reconocer la deformación a la que se ve sometida el espécimen. Por lo que se puede concluir que el patrón ha de ser regular en toda la superficie de análisis y ha de poseer un alto contraste de blancos y negros, con objeto de que el sistema óptico capte su evolución correctamente.

A continuación, en la *Figura 16*, pasa a mostrarse el patrón estocástico aplicado sobre las muestras objeto de estudio. Es necesario tener en cuenta que en las inmediaciones de la zona de interés se han generado puntos negros de menor tamaño, con el fin de obtener una escala de grises en las imágenes digitales de mayor precisión para reducir los tamaños de las facetas y las ventanas de búsqueda en la imagen deformada.

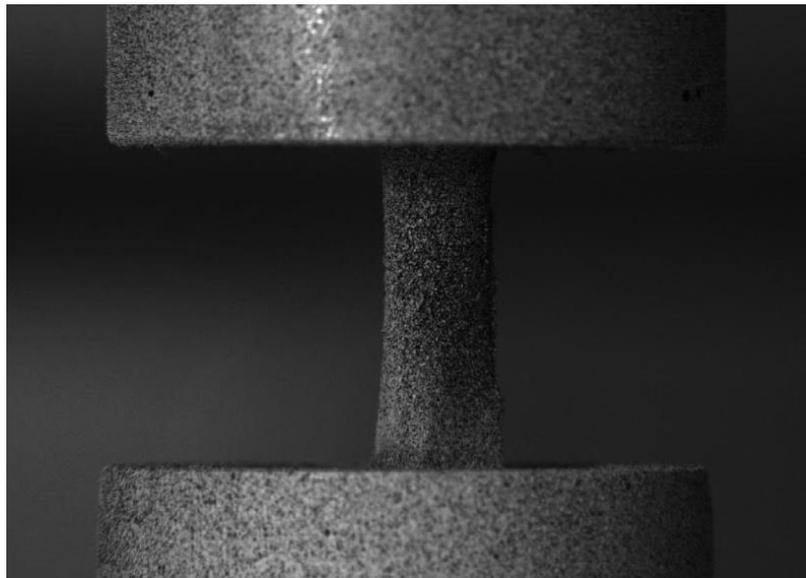


Figura 16. Patrón estocástico

Para la aplicación del patrón, se ha elegido una pintura espray que no contenga en su composición elementos como Calcio, Magnesio y Fósforo para que al analizar posteriormente la composición de los huesos no se vean falseados sus resultados.

Una vez la muestra está preparada y el ensayo listo se toma una foto de referencia (situación indeformada) sin carga. Posteriormente se pasa a tomar imágenes durante el proceso de deformación. Todas las imágenes deformadas muestran un patrón estocástico relativo al inicial.

Como pasa a mostrarse en la *Figura 17*, en la imagen de referencia (antes de la deformación), se pueden localizar cuatro puntos con diferentes escalas de grises que representan cuatro píxeles diferentes. En una imagen tomada al deformar la probeta (después de la deformación), se pueden observar los cuatro mismos puntos, pero representando otra disposición diferente.

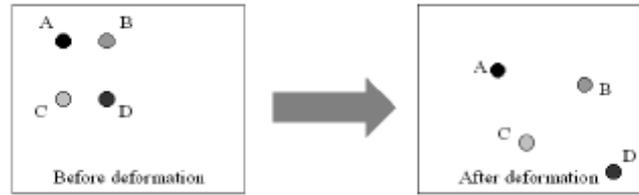


Figura 17. Correlación de imágenes

Con ayuda de un software las diferencias entre estos patrones pueden ser calculadas comparando el posicionamiento de todos los píxeles de la imagen de referencia y cualquiera de las imágenes deformadas, pudiendo crear un mapa de distribución de deformaciones. Mediante el uso de un algoritmo, esta diferencia se puede traducir a términos de deformación.

Las imágenes se tomaron con una cámara digital *LIMES* y una velocidad de captura de 10 fps, una lente fija de 10 mm, una precisión de desplazamiento de 0.01 pixel y una precisión de deformación de 0.02%. Además, se empleó una fuente de luz externa para mejorar el contraste en las imágenes. Los elementos necesarios para llevar a cabo el ensayo mediante esta técnica pasan a mostrarse en la *Figura 18*.

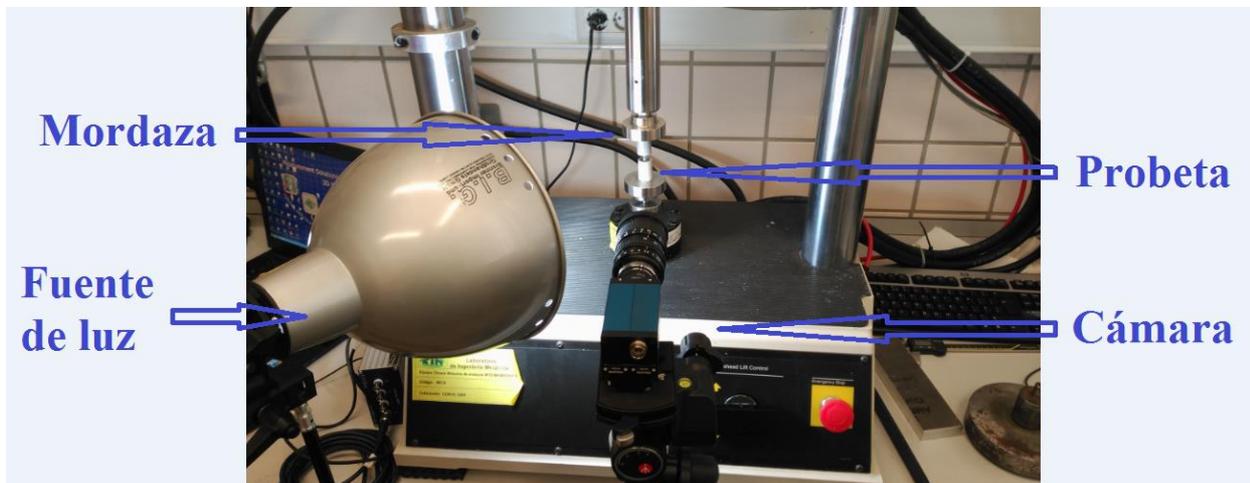


Figura 18. Descripción de elementos

Los distintos elementos deben disponerse según se detalla en la *Figura 19*. La cámara debe posicionarse a la misma altura que la muestra, con la muestra centrada y el eje óptico normal a ella.

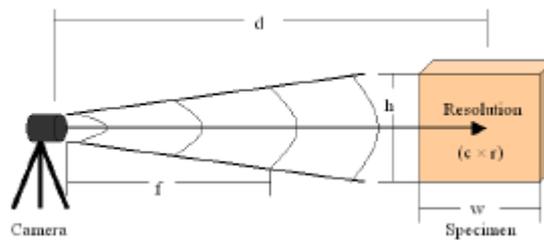


Figura 19. Disposición de elementos. Video-correlación

Un alineamiento cuidadoso es la clave para la obtención de unos resultados precisos debido a la acumulación de errores que se obtienen cuando el espécimen se desalinea o se mueve fuera del plano. Los resultados dependerán de la resolución de la imagen digital, píxeles, la anchura y la altura de la muestra, la distancia entre la cámara y la muestra, la longitud focal de la lente, y la aplicación del patrón estocástico.

Para llevar a cabo las capturas y posteriormente calcular las deformaciones a las que están sometidas las muestras durante el ensayo de compresión, se hará uso de los programas que se pasan a comentar a continuación.

3.7.1 Videocorrelación. Vic Snap 2009

Vic-Snap es un módulo de adquisición. Al mostrarnos imagen en vivo, se pueden ajustar todos los parámetros tanto del software como de la cámara lo cual nos ayuda a realizar los ajustes previos que hay que realizar sobre ésta.

Durante la realización de las capturas se conecta al equipo una salida analógica con varios canales que permite almacenar la información proporcionada por la máquina de ensayo, y referenciarla a cada una de las capturas realizadas. El equipo proporciona los resultados en términos de voltaje, al ser los adquiridos por la célula de carga, y es mediante un factor de multiplicación asociado al canal correspondiente como llevaremos a cabo la conversión voltaje-newton.

Se ha considerado conveniente realizar las capturas de manera automática mediante disparos equi-espaciados 5 segundos para tener así un número considerable de capturas durante la realización del ensayo de compresión.

Como se desarrolló en el apartado 3.6 *Ensayos de compresión*, la duración total de los ensayos es de 240s por lo que se obtendrán alrededor de 50 capturas durante la realización de estos.

3.7.2 Videocorrelación. Vic 2D

Vic-2D es el módulo de post-procesado que nos permite realizar la correlación de las imágenes tomadas y el cálculo de los desplazamientos y deformaciones en ensayos sobre probetas planas. Usa la técnica de correlación de imágenes digitales para realizar medidas de deformaciones en un contorno bidimensional, sobre superficies planas.

Algunas de las características que presenta el sistema Vic-2D son un procesamiento en tiempo real de datos, adquisición de datos de carga sincronizada y salida analógica disponible para el control de la máquina. Vic-2D puede medir desplazamientos y las tensiones en el plano, para tamaños de muestras que van desde menores de 1 mm a mayores de 10 m.

Para el análisis de las capturas tomadas es necesario llevar a cabo una serie de pasos que pasan a detallarse a continuación. En la *Figura 20* se muestran los elementos que pasan a comentarse.

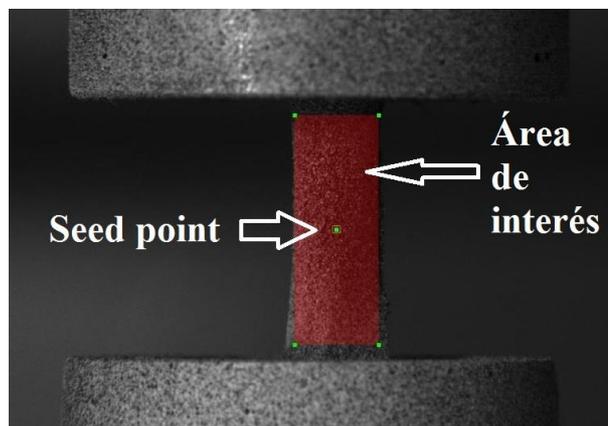


Figura 20. Selección área de interés y seed point

- Selección de la imagen de referencia. La ***imagen de referencia*** es la que se toma antes de comenzar a realizar el ensayo de compresión. El posicionamiento de los píxeles en las diferentes capturas las realiza respecto a esta imagen de referencia.
- Definición del área de interés. En la imagen de referencia, definiremos el ***área de interés*** de nuestro ensayo. Será únicamente en el espacio definido donde calcule el programa la deformación experimentada durante la realización del ensayo. Una vez seleccionada el área, se selecciona el valor del subset (subconjunto) y del step (espaciado de puntos que se analizan durante la correlación) adecuados para que los resultados sean lo más precisos posibles.
- Posicionamiento del seed point. En el área de interés definida se establecerá un punto denominado ***seed point*** a partir del cual se inicia la correlación. La colocación del ***seed point*** puede influir mucho en la dificultad de realizar una estimación inicial. Idealmente, éste debe situarse en una zona donde la distribución del patrón estocástico sea lo más homogénea posible, y las motas sean fácilmente identificables. Los algoritmos de correlación utilizan los resultados del ***seed point*** para obtener una estimación inicial para el segundo punto a analizar, barriendo de este modo todos los puntos correspondientes al ***área de interés***.

Una vez analizadas las imágenes, se pueden obtener resultados de formas muy diversas debido a que el programa dispone de una gran variedad de opciones. A continuación, se nombran las que pueden resultar de mayor interés: representación de las deformaciones con un mapa de contorno, visualización de una animación de la evolución de las deformaciones, representación de la evolución de una deformación a lo largo de una línea y obtención del valor promedio de las deformaciones para un área determinada.

Como se puede observar, la gran variedad de opciones de las que dispone el programa Vic-2D permite obtener información de lo más variada, haciendo que el uso de esta técnica sea idóneo para medir las deformaciones a lo largo de un área de interés. Pero es necesario tener en cuenta que existen multitud de variables que pueden representarse tras el post-procesado de los datos.

El objetivo del uso de esta técnica es determinar la deformación principal a la que se ve sometida la muestra durante la aplicación del ensayo de compresión. Al tratarse de un ensayo de compresión, la deformación mínima (que es máxima en módulo) ocurre en la dirección de aplicación de la fuerza, tratándose de la dirección vertical típicamente, por lo que $\varepsilon_2 = \varepsilon_y$. En consecuencia, la deformación máxima (mínima en módulo) ocurre en la dirección perpendicular (horizontal): $\varepsilon_1 = \varepsilon_x$.

Tras llevar a cabo una breve descripción del software utilizado para evaluar las deformaciones de las muestras, y los pasos que son necesarios seguir para analizar las distintas capturas, se pasa a comentar las consideraciones que se han tenido en cuenta de cara a evaluar los resultados obtenidos en las áreas mostradas en la *Figura 11*. La deformación se ha obtenido a largo de tres rectángulos dispuestos a lo largo de la probeta, como se muestra en la *Figura 21*.

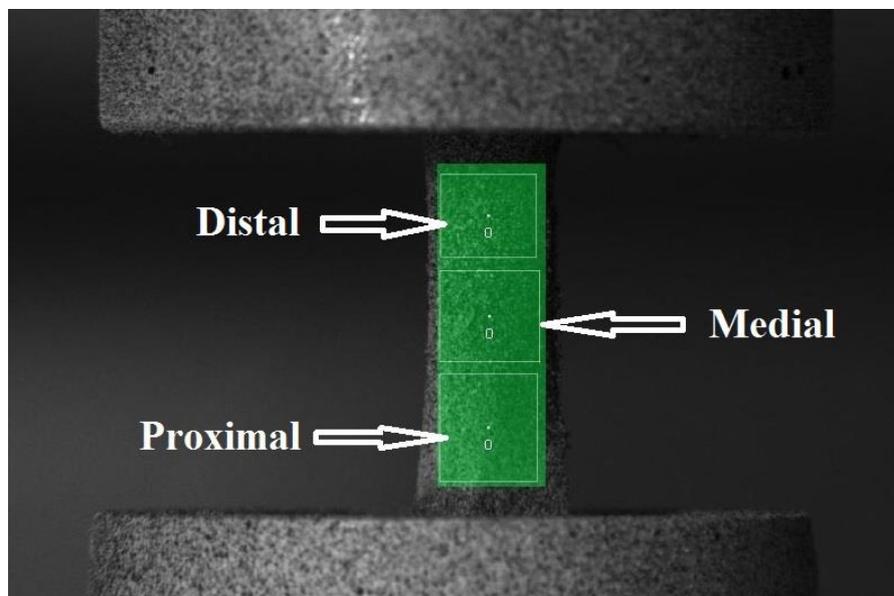
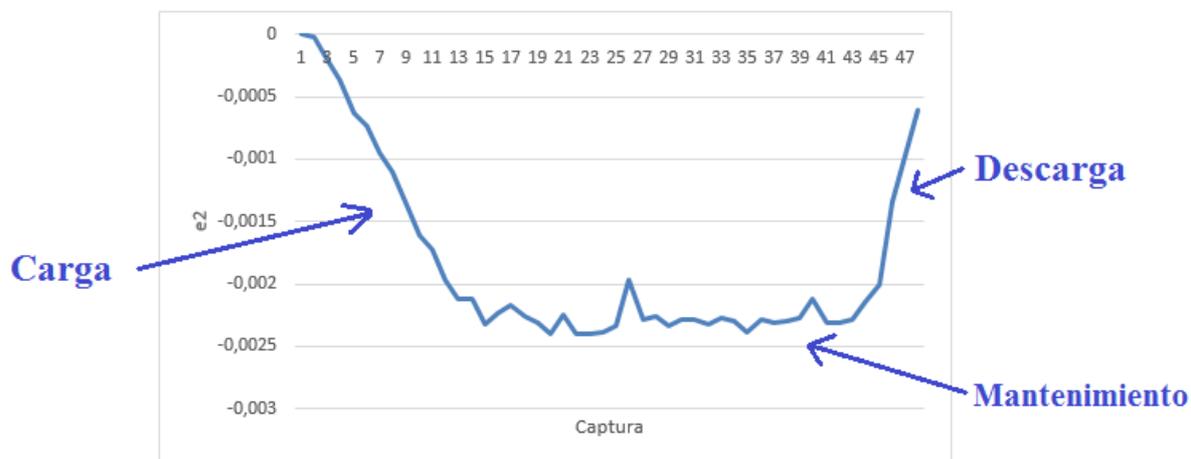


Figura 21. Selección de zonas. Cálculo de deformación

Tras el pertinente tratamiento del conjunto de fotogramas capturados, se obtuvo evolución por parte de la deformación principal mínima (deformación longitudinal, la cual es máxima en módulo) que pasa a mostrarse en la *Gráfica 3*.



Gráfica 3. Valores de deformación durante un ensayo

La evaluación mostrada corresponde a la deformación que experimenta la zona a evaluar. La forma de la curva es debida al tipo de compresión aplicada. En ella se pueden distinguir las tres zonas de carga, mantenimiento y descarga descritas anteriormente.

3.8 Evaluación del área

Una vez ensayadas las muestras, pasaron a cortarse las muestras con una sierra *Flein Multimaster MS x315*. Se han realizado los cortes necesarios para evaluar el área transversal de hueso en las tres zonas de interés: proximal, medial y distal. En la siguiente imagen se puede ver el montaje que se realizó para el corte de los huesos:



Figura 22. Montaje para el corte de huesos

Una vez cortadas, se pulieron y recubrieron de plastilina negra las muestras para facilitar su posterior visualización al microscopio. Aquí se observa cómo se analizaron las muestras una vez preparadas:

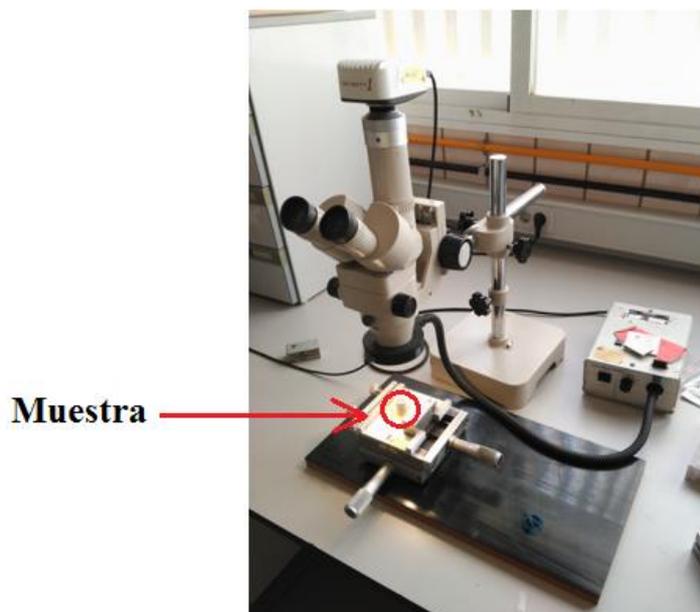


Figura 23. Montaje para la toma de capturas de evaluación de área transversal

3.8.1 Perfect image

Este ha sido el programa usado para llevar a cabo la captura de las secciones a analizar. Las capturas han sido realizadas con una cámara *Infinity 1-2 de 2.0 Megapixel Scientific CMOS*. Sobre las propias imágenes pueden hacerse mediciones muy variadas, lo que permite poder evaluar el área cómodamente y además con gran precisión (centésima de micrómetro). A continuación, pasa a mostrarse dos de las imágenes tomadas:

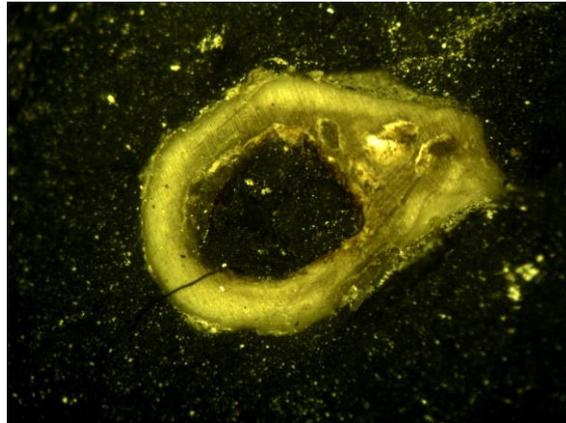


Figura 24. Captura Perfect image de área transversal de hueso. Zona proximal

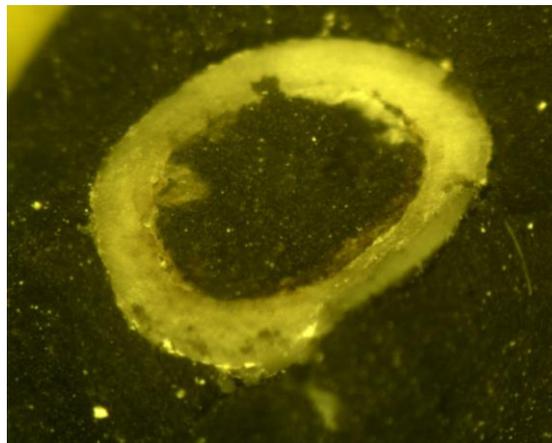


Figura 25. Captura Perfect image de área transversal de hueso. Zona distal

Es necesario tener en cuenta que, a la hora de evaluar el área de las mismas, se ha creído conveniente no tratar la totalidad del área como tejido óseo, es decir, en el cálculo del módulo elástico se ha estimado un tanto por ciento del área obtenida mediante este programa ya que la zona interna y externa del área no presentan la misma rigidez.

4 RESULTADOS

Las herramientas utilizadas para el post-procesado de datos han sido Matlab y Microsoft Office Excel. En este apartado se mostrarán los resultados sin tener en cuenta las diferentes posiciones ensayadas (anterior y posterior), es decir, sin tener en cuenta el efecto de flexión, el cual se desarrollará con detalle en el *Anexo 1*.

4.1 Módulo elástico medio y dispersión

Una vez realizado el ensayo de compresión (del cual sacamos directamente la fuerza), evaluando las deformaciones mediante las técnicas de videocorrelación ya expuestas y calculando el área de las secciones transversales de hueso, se obtiene el valor del módulo elástico.

En primer lugar, se muestran las tablas de resultados medios (para las dos posiciones ensayadas) de cada grupo. Como ya se ha explicado, vamos a dividir la zona media de hueso (la que queda sin embeber en la probeta), con tramos cuasi rectos, en tres zonas: distal, medio y proximal. Por esto se muestran los resultados en las tres zonas diferentes. A su vez, como hay cinco animales para cada uno de los tres grupos, se muestran los resultados para cada uno de los animales, recalcando en negrita los resultados medios de los cinco sujetos:

GRUPO 1 (30 SEMANAS)						
	Izquierda			Derecha		
	Distal	Medio	Proximal	Distal	Medio	Proximal
Animal 1	15.26	21.44	28.77	22.49	21.62	22.55
Animal 2	17.44	15.67	16.72	23.36	22.63	22.55
Animal 3	15.38	21.50	23.12	12.36	16.99	19.13
Animal 4	25.53	24.32	21.12	13.65	16.18	23.72
Animal 5	21.76	22.47	22.63	22.82	23.51	24.14
Media	19.07	21.08	22.47	18.93	20.18	22.41
Dispersión	3.99	2.90	3.88	4.87	3.01	1.76

Tabla 1. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión (por zonas). Grupo 1

Para el grupo 1, obtenemos unos resultados medios del módulo elástico de:

- Zona distal: 19.07 GPa fémur izquierdo, 18.93 GPa fémur derecho
- Zona media: 21.08 GPa fémur izquierdo, 20.18 GPa fémur derecho
- Zona proximal: 22.47 GPa fémur izquierdo, 20.41 GPa fémur derecho

La desviación estándar en los resultados, es la siguiente:

- Zona distal: 3.99 fémur izquierdo, 4.87 fémur derecho
- Zona media: 2.90 fémur izquierdo, 3.01 fémur derecho
- Zona proximal: 3.88 fémur izquierdo, 1.76 fémur derecho

GRUPO 2 (10 SEMANAS)						
	Izquierda			Derecha		
	Distal	Medio	Proximal	Distal	Medio	Proximal
Animal 1	17.78	19.76	18.70	17.30	18.65	17.40
Animal 2	13.03	13.18	13.01	15.62	15.41	11.10
Animal 3	15.37	16.64	18.31	13.84	16.29	18.41
Animal 4	16.07	16.60	17.00	13.76	17.20	19.29
Animal 5	14.97	14.38	14.67	12.96	14.12	15.79
Media	15.44	16.11	16.34	14.69	16.33	16.40
Dispersión	1.54	2.25	2.18	1.57	1.54	2.89

Tabla 2. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión (por zonas). Grupo 2

Para el grupo 2, obtenemos unos resultados medios del módulo elástico de:

- Zona distal: 15.44 GPa fémur izquierdo, 14.69 GPa fémur derecho
- Zona media: 16.11 GPa fémur izquierdo, 16.33 GPa fémur derecho
- Zona proximal: 16.34 GPa fémur izquierdo, 16.40 GPa fémur derecho

La desviación estándar en los resultados, es la siguiente:

- Zona distal: 1.54 fémur izquierdo, 1.57 fémur derecho
- Zona media: 2.25 fémur izquierdo, 1.54 fémur derecho
- Zona proximal: 2.18 fémur izquierdo, 2.89 fémur derecho

GRUPO 3 (4 SEMANAS)						
	Izquierda			Derecha		
	Distal	Medio	Proximal	Distal	Medio	Proximal
Animal 1	4.95	5.10	4.67	4.84	5.30	6.61
Animal 2	2.32	4.76	7.16	7.00	7.48	6.94
Animal 3	3.66	4.35	5.21	2.89	4.41	5.22
Animal 4	2.98	6.66	10.24	5.86	6.20	5.48
Animal 5	4.95	5.71	6.42	4.95	5.80	6.42
Media	3.77	5.31	6.74	5.11	5.84	6.13
Dispersión	1.05	0.81	1.96	1.35	1.01	0.67

Tabla 3. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión (por zonas). Grupo 3

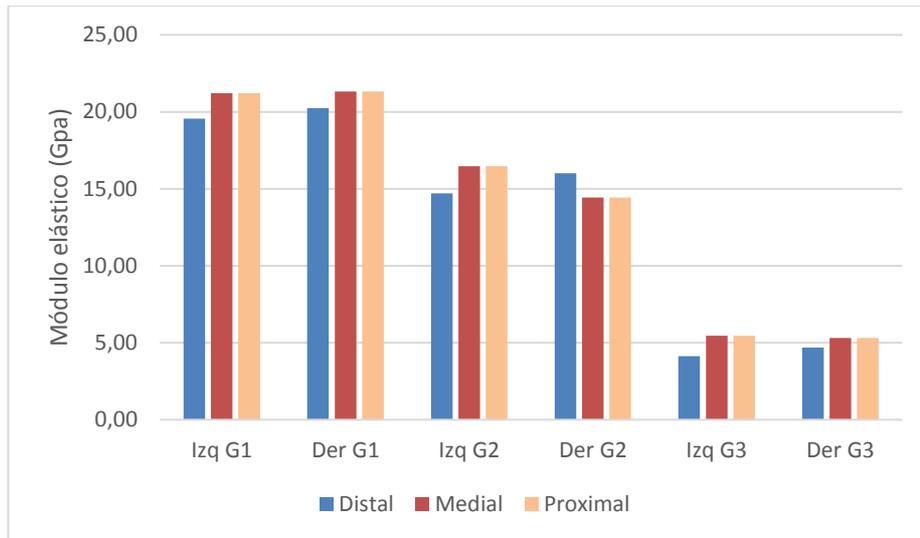
Para el grupo 2, obtenemos unos resultados medios del módulo elástico de:

- Zona distal: 3.77 GPa fémur izquierdo, 5.11 GPa fémur derecho
- Zona media: 5.31 GPa fémur izquierdo, 5.84 GPa fémur derecho
- Zona proximal: 6.74 GPa fémur izquierdo, 6.13 GPa fémur derecho

La desviación estándar en los resultados, es la siguiente:

- Zona distal: 1.05 fémur izquierdo, 1.35 fémur derecho
- Zona media: 0.81 fémur izquierdo, 1.01 fémur derecho
- Zona proximal: 1.96 fémur izquierdo, 0.67 fémur derecho

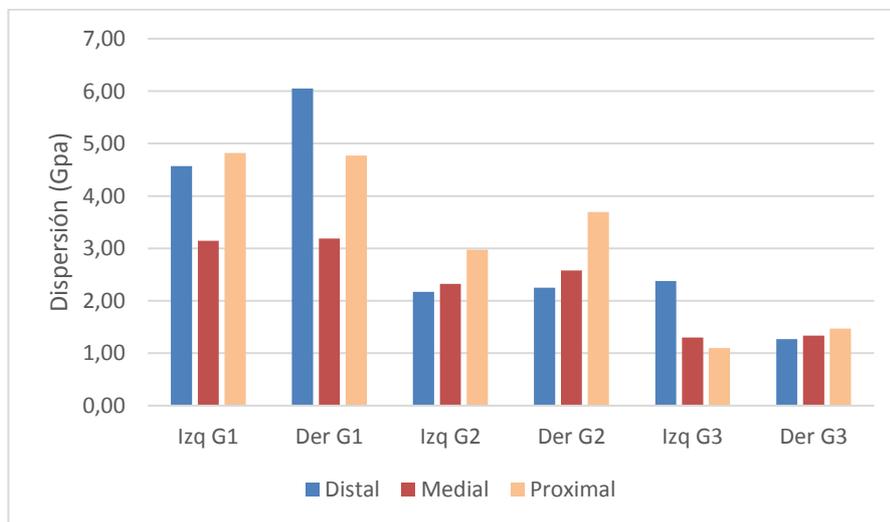
Ahora se puede ver representado el valor medio del módulo elástico para las diferentes zonas evaluadas, en los 3 grupos analizados, diferenciando los huesos de pierna izquierda y derecha de los diferentes animales. Se muestra un gráfico de barras para poder visualizar y comparar mejor los resultados. A la izquierda, el grupo 1; en el centro, el grupo 2; y a la derecha, el grupo 3. Para cada grupo se muestra a la izquierda el valor del módulo elástico medio de la pierna izquierda; y a la derecha, los de la pierna derecha. En azul, se muestran los resultados de la zona distal, mientras que en rojo se visualiza los de la zona media y en naranja, la zona proximal.



Gráfica 3. Módulo elástico medio (GPa) por grupo y zona

Como se puede observar a simple vista, los valores del módulo de Young medio para el grupo 1 están en torno a 20 GPa; para el grupo 2, alrededor de 15 GPa; y para el grupo 3, aproximadamente 5 GPa.

Aquí pasa a mostrarse, de forma análoga, la desviación típica (en media) que se ha producido en los resultados de los diferentes grupos. Divididos por grupos, por zona, y diferenciando pierna izquierda y derecha, igual que anteriormente.



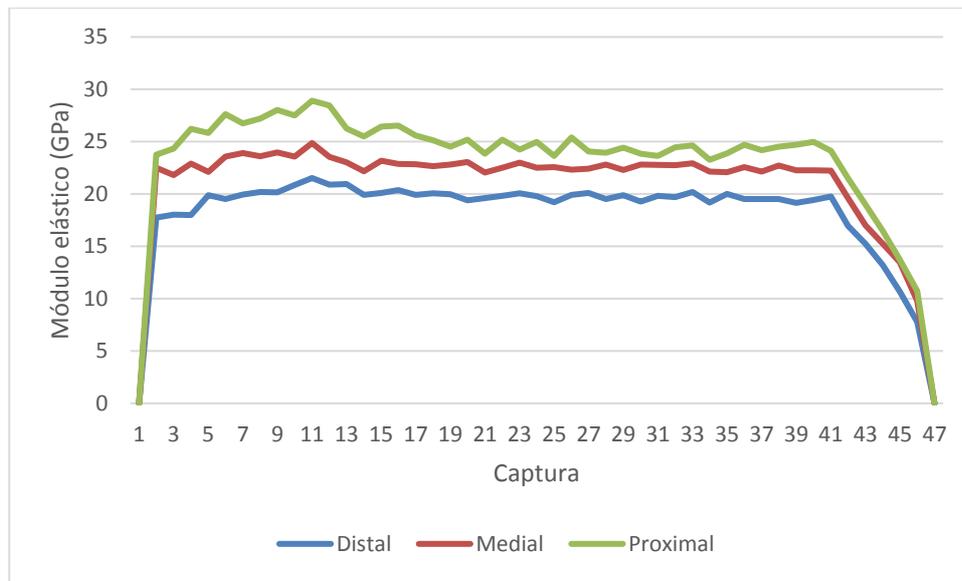
Gráfica 4. Dispersión por grupo y zona

Para el grupo 1 aparecen las mayores desviaciones, entre 3 y 6; para el grupo 2, en torno a 2 y 3; y para el grupo 3, aparecen las menores desviaciones, entre 1 y 2.

Para los valores tanto de módulo elástico como de dispersión ocurre lo mismo: el grupo 1 es el que tiene los valores más altos, disminuyen para el grupo 2 y los valores menores se dan en el grupo 3

4.2 Módulo elástico por zona

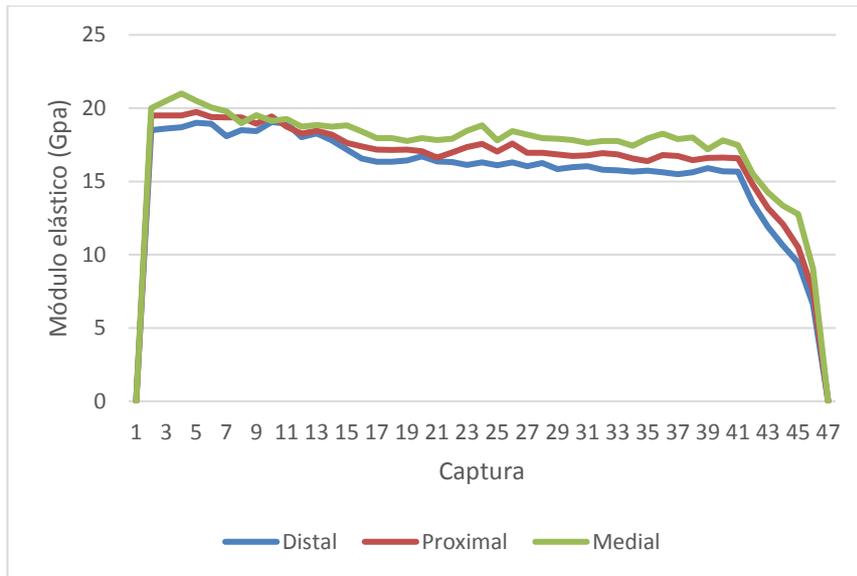
En este apartado se mostrará la evolución que sigue el módulo elástico durante los ensayos, representándose los módulos elásticos medios de cada grupo por separado. Las diferentes curvas corresponden con las distintas zonas evaluadas. Se pueden ver claramente en las gráficas las diferentes fases que tienen los ensayos: en primer lugar una fase de carga, después la más larga de mantenimiento, y finalmente una descarga. En azul se muestran los valores para la zona distal, en rojo la zona media y en verde la zona proximal.



Gráfica 5. Módulo elástico (GPa) por zona. Grupo 1

Para el grupo 1, tenemos un módulo elástico medio de:

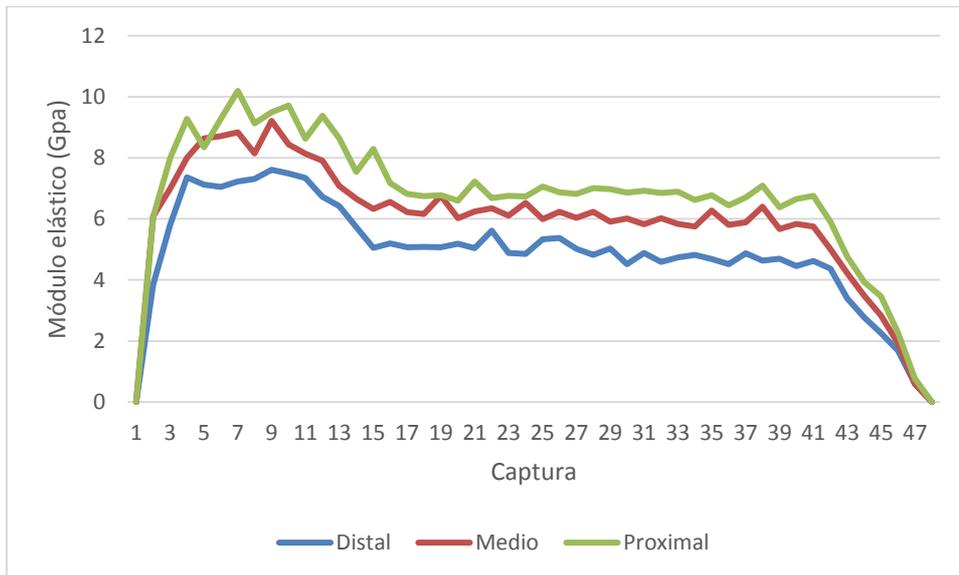
- Zona distal: 19 GPa
- Zona media: 20.63 GPa
- Zona proximal: 21.44 GPa



Gráfica 6. Módulo elástico (GPa) por zona. Grupo 2

Para el grupo 2, tenemos un módulo elástico medio de:

- Zona distal: 15.07 GPa
- Zona media: 16.22 GPa
- Zona proximal: 16.37 GPa



Gráfica 7. Módulo elástico (GPa) por zona. Grupo 3

Para el grupo 3, tenemos un módulo elástico medio de:

- Zona distal: 4.44 GPa
- Zona media: 5.58 GPa
- Zona proximal: 6.44 GPa

5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se muestra a modo de resumen una tabla de valores para todos los grupos, donde se incluye el valor medio del módulo elástico para cada animal: media aritmética de las 3 diferentes zonas (distal, medio, proximal), así como de las dos posiciones ensayadas (anterior y posterior), y del fémur izquierdo y derecho. Así mismo, se muestran resaltados los valores medios de todos los animales, del módulo de Young y la desviación estándar.

	GRUPO 1 (30 SEMANAS)	GRUPO 2 (10 SEMANAS)	GRUPO 3 (4 SEMANAS)
Animal 1	22.02	18.26	5.24
Animal 2	19.73	13.56	5.94
Animal 3	18.08	16.48	4.29
Animal 4	20.75	16.65	6.23
Animal 5	22.89	14.48	5.71
Media	20.69	15.88	5.48
Dispersión	3.40	2.00	1.14

Tabla 4. Módulo elástico medio (GPa) y dispersión

A la vista de los resultados, pueden sacarse las siguientes conclusiones principales:

- No se producen diferencias notorias entre el valor de rigidez de diferentes animales de un mismo grupo (misma edad), ni tampoco entre los valores que se obtienen para el fémur izquierdo y derecho de un mismo animal, como era de esperar.
- Se produce un aumento del módulo elástico, y por tanto, un aumento de la rigidez en los huesos, con el crecimiento. Mientras que para el grupo más pequeño obtenemos un resultado medio del módulo elástico de 5.48 GPa, para el grupo mediano un valor de 15.88 GPa y para el grupo de animales más mayores un resultado de 20.69 GPa.
- La dispersión que se produce en los resultados ($10 \div 20$ %), es debida a múltiples motivos: por un lado, la preparación de las muestras (colocación de los huesos en el útil de alineamiento, colocación de los casquillos, embeber las muestras en resina, etc.) y por otro, la preparación y realización de los ensayos (colocación de la probeta en los platos, colocación de la cámara, fuente de luz, etc.). Es por todo esto por lo que se consideran valores aceptables.

Los resultados que se producen para el grupo 1 (animales de 30 semanas), cuyo módulo elástico medio vale aproximadamente 20 GPa se aproxima a los resultados obtenidos por Marta [16], quien trabajó con animales de entre 24-32 semanas, y obtuvo valores del módulo de Young entre 15 y 25 GPa. A su vez, se puede contrastar con los valores que obtuvieron Ashman y Meunier [9,10], con unos valores medios de módulo elástico de 20.6 GPa y 20.35 GPa, respectivamente. Yoon [6] llegó a un módulo de Young de 27.4 GPa, trabajando con fémures frescos, a diferencia de todos los resultados detallados anteriormente que han sido con fémures secos.

De los grupos 2 y 3, donde se han estudiado animales más jóvenes, no se han encontrado referencias con las que comparar, aunque fijándonos en los valores de crecimiento ya descritos en el apartado 3.1. *Animales*: 18,8% de crecimiento a los 21 días de edad (3 semanas), un 50% a los 56 días (8 semanas) y un 100% a los 112 días (17 semanas) se puede decir que los porcentajes de crecimiento van acordes a los porcentajes de rigidez que puede llegar a alcanzar el hueso:

- Para un 100% de crecimiento (grupo 1) obtenemos un valor de 20.69 GPa, el cual podemos tomar como el 100% de rigidez que podemos alcanzar.
- Para algo más de un 50% de crecimiento (grupo 2) observamos un resultado de 15.88 GPa, lo cual sería alrededor de un 75% de rigidez, según la escala que hemos tomado.
- Para un crecimiento de aproximadamente el 20% (grupo 3) se da un valor de 5.48 GPa, estaríamos en torno a un 25% de rigidez.

Por otro lado, DIC es una excelente herramienta para la medición de la deformación: por un lado, nos permite medir bien las deformaciones cuando los objetos de estudios son de tamaño reducido (en nuestro caso huesos) cosa que con los métodos tradicionales era complicado de realizar; a su vez, obtenemos valores fiables y es un método menos costoso que el de ultrasonidos. Esta técnica se ha adaptado muy bien a nuestro propósito, ya que queríamos medir deformaciones moderadas. En el caso de que se produzca una deformación significativa, el patrón moteado puede distorsionarse excesivamente, dando lugar a una pérdida de datos. Como principal inconveniente se puede recalcar la preparación previa que se necesita llevar a cabo antes de utilizar esta herramienta.

Como ampliaciones futuras posibles a este trabajo, podrían estudiarse más grupos de animales de diferentes edades y poder ver más en detalle cómo va variando la rigidez de los huesos. Así mismo, podrían evaluarse otras propiedades como el coeficiente de poisson o el módulo de rigidez. Por otro lado, se considera que sería interesante ver qué resultados se obtienen utilizando otros métodos diferentes al de videocorrelación.

6 REFERENCIAS

- [1] Bramer J.A.M., Barentsen R.H., vd Elst M, deLange E.S.M., PatkaP., Haarman H.J. Th. M. "Representative assessment of long bones haft biomechanical properties: an optimized testing method". Journal of Biomechanics; 31: 741-745. 1998
- [2] Katsamanis F., Raftopoulos D.D. "Determination of mechanical properties of human femoral cortical bone by Hopkinson bar stress technique". Journal of Biomechanics; 23 (11): 1173-1184. (1990).
- [3] W.C.Oliver, G.M Pharr. *Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology*. J. Mater. Res., Vol. 19, No. 1, Jan 2004.
- [4] Jingzhou Zhang, Glen L. Niebur, Timothy C. Ovaert. *Mechanical property determination of bone through nano- and micro- indentation testing and finite element simulation, 2007*. Journal of Biomechanics 41 (2008) 267-275.
- [5] Rho J.Y., Ashman R.B., Turner Ch.H. "Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements". Journal of Biomechanics; 26 (2): 111-119. 2003.
- [6] Yoon, H.S., Katz, J.L. "Ultrasonic wave propagation in human cortical bone: II. Measurements of elastic properties and microhardness". Journal of Biomechanics; 9: 459-464. Aguilar Peris, J.(1989): Curso de Termodinámica. Alhambra Longman .pp. 166. 1998
- [7] Crolet J.M., Aoubiza B., Meunier A. "Compact bone: Numerical simulation of mechanical characteristics". Journal of Biomechanics; 26 (6): 677-687. 1983
- [8] Lakes R.S. "On the torsional properties of single osteons". <http://silver.neep.wisc.edu/~lakes/osteons.html>. 1995.
- [9] Ashman R.B., Rho J.Y. "Elastic modulus of trabecular bone material". Journal of Biomechanics; 21: 177-181. 2008
- [10] Meunier a., Riot O., Christel P., Katz J.L., Sedel L. "Inhomogeneities in anisotropic elastic constants of cortical bone". Ultrasonics Symposium. 1015-1018. 2002
- [11] Marco Cossio-Bolaños, Rossana Gómez Campos, Rodrigo Vargas Vitoria, Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça y Miguel de Arruda. *Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas Wistar*. Nutrición Hospitalaria , 28(6):2151-2156, 2013.
- [12] Enesco M, Leblond P. *Increase in cell number as factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat*. J Embryol Exp Morph, 10 (4): 530-62, 1962
- [13] Layman DK, Hegarty PVJ, Swan PB. *Comparison of morphological and biochemical parameters of growth in rat skeletal muscles*. J Anat 130 (1): 159-71, 1980.

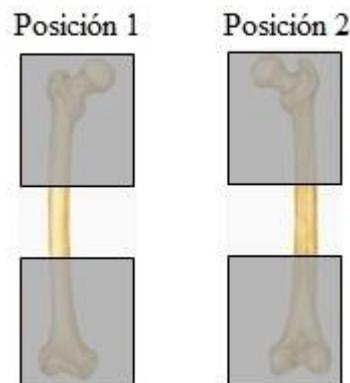
- [14] Tarun Goswami, *Human musculoskeletal biomechanics*. 2012
- [15] Antonia Dalla Pria Bankoff, *Biomechanical characteristics of the bone*. Tesis. University Of Campinas, (Brazil). 2012
- [16] Marta Ruiz, *Ensayos para la evaluación de propiedades mecánicas en fémures de rata*, Universidad de Sevilla, 2014.
- [17] Alessandra Carriero, Lisa Abela, Andrew A.Pitsillides, Sandra J. Shefelbine. *Ex vivo determination of bone tissue strains for an in vivo mouse tibial loading model*. Journal of Biomechanics 47:2490–2497, 2014
- [18] Michael D. Brodt, Cara B. Ellis, Matthew J. Silva. *Growing C57Bl/6 Mice Increase Whole Bone Mechanical Properties by Increasing Geometric and Material Properties*. Journal of Bone and Mineral Research. Volume 14, Number 12, 1999.
- [19] Vaida Glatt, Ernesto Canalis, Lisa Stadmeier, Mary L Bouxsein. *Age-Related Changes in Trabecular Architecture Differ in Female and Male C57BL/6J Mice*. Journal of Bone and Mineral Research. Volume 22, Number 8, 2007.
- [20] Tarpit K. Patel, Michael D. Brodt, Matthew J. Silva. *Experimental and finite element analysis of strains induced by axial tibial compression in young-adult and old female C57Bl/6mice*. Journal of Biomechanics 47:451–457, 2014.
- [21] Pavel Sztetek , Maximilien Vanleene, Robin Olsson, Rebecca Collinson , Andrew A. Pitsillides, Sandra Shefelbine. *Using digital image correlation to determine bone surface strains during loading and after adaptation of the mouse tibia*. Journal of Biomechanics 43:599–605, 2010.
- [22] Bing Pan, Kemao Qian, Huimin Xie and Anand Asundy. “Two dimensional digital image correlation for in-plane displacement and strain measurement : a review”. Meas. Sci. Technol 20, 2009.
- [23] D. Lecompte, A. Smits, Sven Bossuyt, H. Sol, J. Vantomme, D. Van Hemelrijck, A.M. Habraken, “Quality assessment of speckle patterns for digital image correlation”, Optics and Lasers In Engineering Vol 44.
- [24] Martínez-Donaire A.J. *Análisis del efecto del gradiente de deformaciones en el conformado de chapa metálica*. Tesis. Universidad de Sevilla. 2012
- [25] Bryant C. Roberts, Egon Perilli, Karen J. Reynolds. *Application of the digital volume correlation technique for the measurement of displacement and strain fields in bone: A literature review*. Journal of Biomechanics 47:923–934, 2014.
- [26] Yihao Zhou, Chen Sun, Yuntao Song, Jubing Chen. *Image pre-filtering for measurement error reduction in digital image correlation*. Optics and Lasers in Engineering 65:46–56, 2015.

7 ANEXOS

7.1 Valor medio del módulo elástico por posición y grupo

El objetivo de este anexo es recoger los valores medios de los módulos elásticos para cada uno de los grupos ensayados. Estos valores se detallan en las tablas adjuntas llevando a cabo una clasificación por posición y área de estudio.

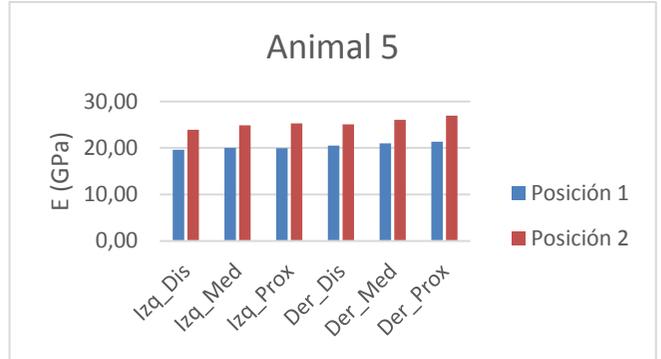
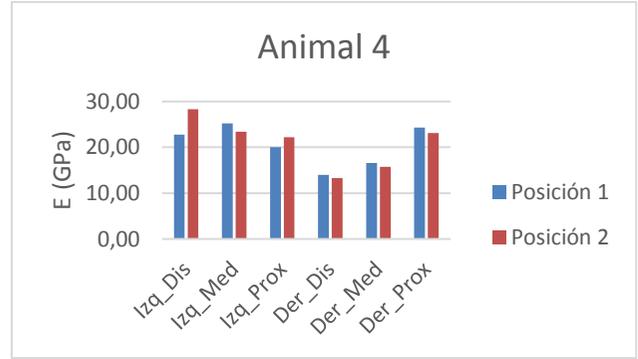
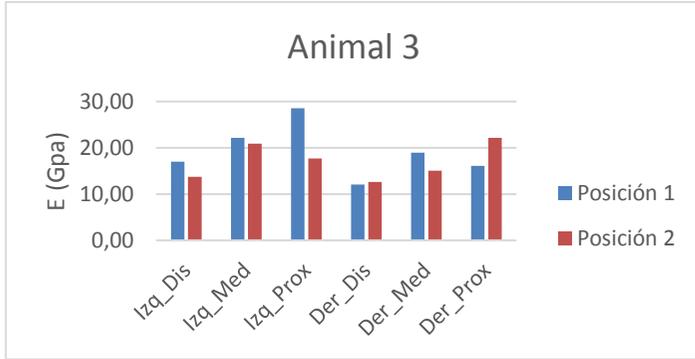
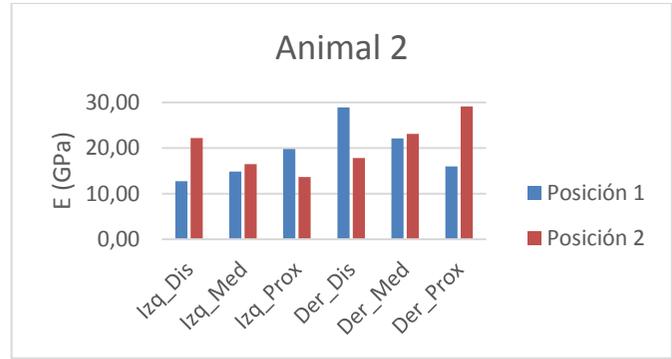
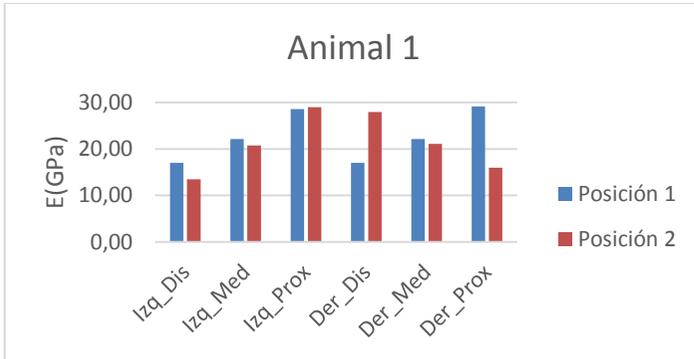
Las posiciones ensayadas son las que pasan a mostrarse a continuación, siendo la *posición 1* la cara anterior de la muestra embebida, y la *posición 2* la cara posterior.



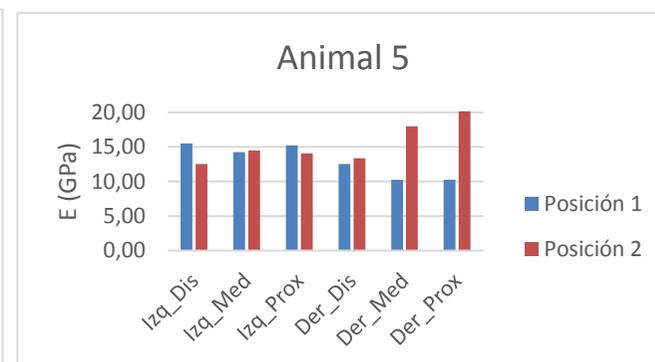
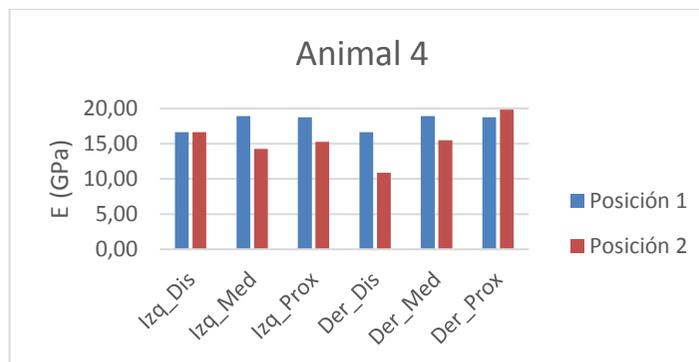
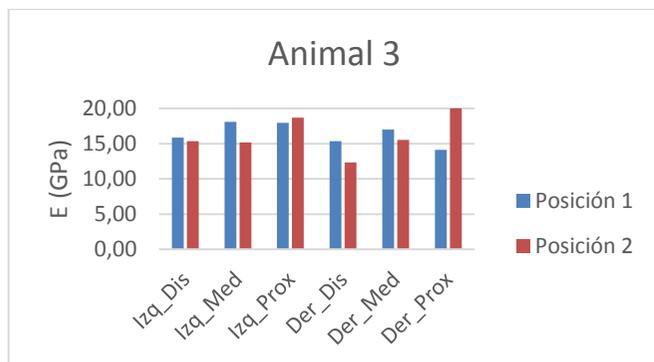
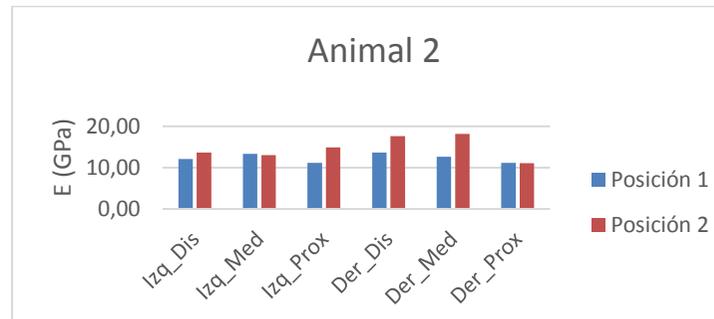
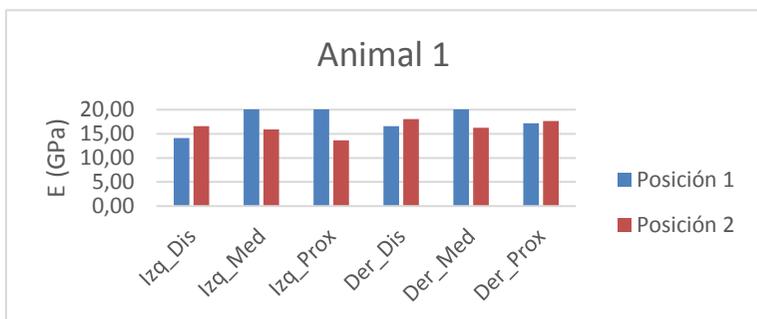
Las probetas fueron sometidas a compresión en diferentes posiciones con el fin de observar su comportamiento anisótropo y si se introduce componente a flexión debido un incorrecto alineamiento de la misma.

Como se especifica en la memoria adjunta, la finalidad de ensayar las muestras por ambas posiciones es analizar si existe flexión fuera del plano durante la realización del ensayo de compresión, ya que como se ha comentado anteriormente, al calcular las deformaciones mediante técnicas 2D no podríamos evaluar este efecto aplicando dicha técnica.

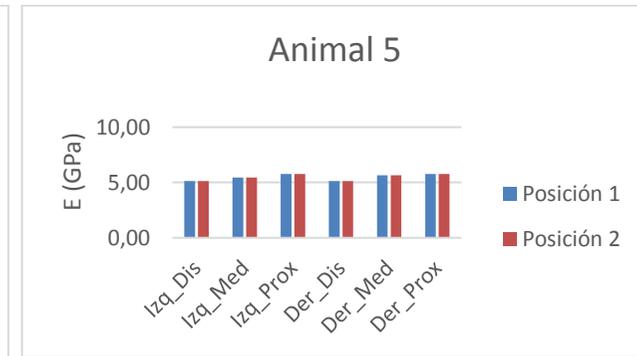
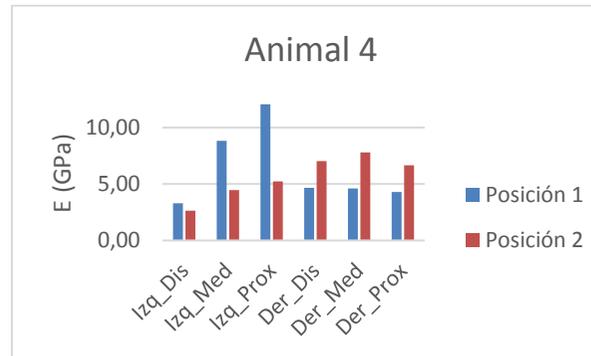
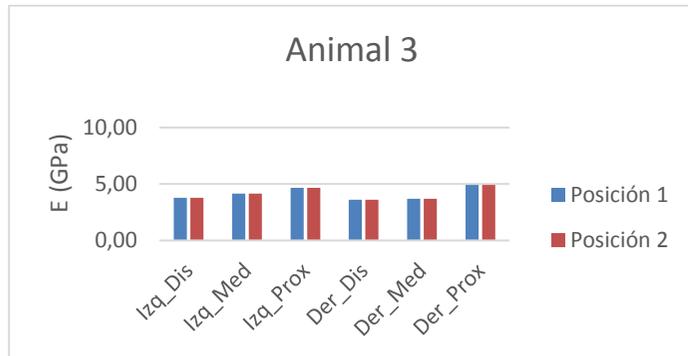
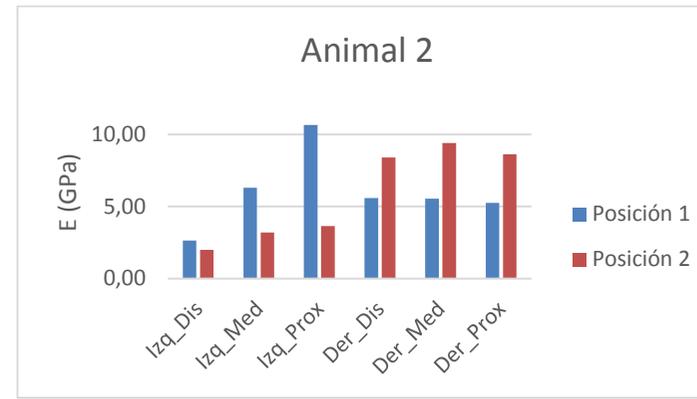
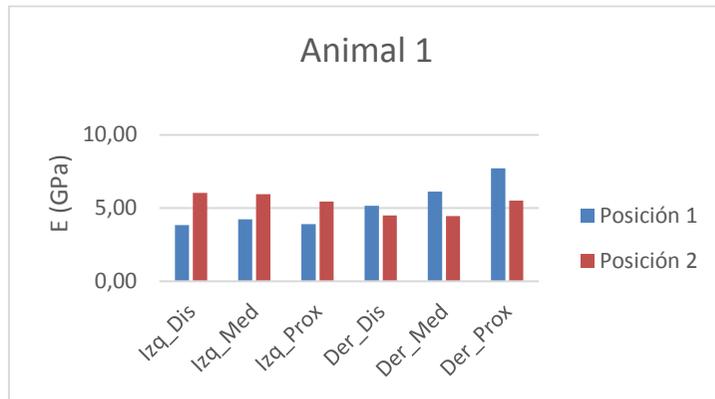
Este efecto puede llevarse a cabo debido a un incorrecto alineamiento del hueso en la fase de preparación de la muestra. Para que este fenómeno no existiera, deberían ser exactamente iguales los valores obtenidos en las posiciones 1 y 2.



GRUPO 1 (30 SEMANAS)												
	Izquierda						Derecha					
	Anterior			Posterior			Anterior			Posterior		
	Distal	Medio	Proximal									
Animal 1	17.01	22.11	28.54	13.50	20.77	29.00	17.02	22.11	29.14	27.95	21.13	15.95
Animal 2	12.70	14.88	19.78	22.18	16.45	13.65	28.87	22.12	15.95	17.84	23.14	29.14
Animal 3	17.01	22.11	28.54	13.74	20.89	17.70	12.07	18.94	16.12	12.64	15.03	22.13
Animal 4	22.75	25.21	20.04	28.30	23.42	22.20	14.00	16.58	24.28	13.29	15.77	23.15
Animal 5	19.60	20.04	19.99	23.92	24.89	25.26	20.55	20.97	21.32	25.09	26.05	26.95
Media	17.81	20.87	23.38	20.33	21.28	21.56	18.50	20.14	21.36	19.36	20.22	23.46



GRUPO 2 (10 SEMANAS)												
	Izquierda						Derecha					
	Anterior			Posterior			Anterior			Posterior		
	Distal	Medio	Proximal									
Animal 1	14.13	23.63	23.78	21.43	15.88	13.61	16.57	21.02	17.17	18.03	16.27	17.62
Animal 2	12.07	13.36	11.13	13.99	12.99	14.88	13.61	12.64	11.15	17.62	18.18	11.05
Animal 3	15.85	18.09	17.95	14.89	15.19	18.67	15.36	17.02	14.11	12.32	15.56	22.70
Animal 4	16.62	18.93	18.75	15.51	14.26	15.25	16.62	18.93	18.74	10.89	15.47	19.83
Animal 5	15.51	14.25	15.25	14.43	14.51	14.09	12.54	10.24	10.26	13.38	17.99	21.32
Media	14.84	17.65	17.37	16.05	14.57	15.30	14.94	15.97	14.29	14.45	16.69	18.50



GRUPO 3 (4 SEMANAS)												
	Izquierda						Derecha					
	Anterior			Posterior			Anterior			Posterior		
	Distal	Medio	Proximal									
Animal 1	3.85	4.24	3.90	6.04	5.95	5.44	5.17	6.13	7.71	4.50	4.46	5.51
Animal 2	2.64	6.31	10.66	1.99	3.20	3.65	5.58	5.55	5.26	8.41	9.40	8.62
Animal 3	3.52	4.54	5.74	3.79	4.16	4.67	2.17	5.11	5.53	3.61	3.71	4.91
Animal 4	3.31	8.83	15.23	2.64	4.48	5.24	4.68	4.60	4.30	7.04	7.79	6.65
Animal 5	4.76	5.96	7.08	5.14	5.46	5.76	4.76	5.96	7.08	5.14	5.64	5.76
Media	3.62	5.98	8.52	3.92	4.65	4.95	4.47	5.47	5.98	5.74	6.20	6.29

7.2 Correlación de imágenes digitales. Modelo

La técnica de correlación de imágenes calcula el movimiento en cada uno de los puntos de las imágenes comparando la imagen en estudio con la imagen de referencia. Para su cálculo, la imagen es dividida de forma uniforme en distintos conjuntos, generalmente cuadrados, llamados facetas. Cada faceta será procesada para calcular el valor medio de la escala de grises existente en cada una de ellas y se buscará la misma faceta en la imagen deformada.

Para evaluar cada una de las facetas de la imagen de referencia y la de la imagen deformada, existen diversas funciones o coeficientes de correlación típicamente empleados en esta técnica, entre los que destacan la diferencia absoluta, los mínimos cuadrados y la correlación cruzada.

El principio del método es identificar cada uno de los puntos de la malla en la imagen final mediante comparación de nivel de grises en la faceta correspondiente en cada punto. El tamaño de la faceta utilizada para llevar a cabo estos ensayos ha sido de 21x21 píxeles, adecuado en la búsqueda del equilibrio entre precisión y tiempo de computación.

7.2.1 Algoritmo de correlación

El algoritmo de correlación hace un seguimiento del nivel de grises y transforma las posiciones de cada faceta.

El nivel de grises de la imagen inicial se representa, por cada faceta, mediante una función discreta $f(x, y)$ la cual se transforma en otra función $f'(x', y')$ tras sufrir la deformación, esto es, $f'(x', y') = f(x + u(x, y), y + v(x, y))$, donde $u(x, y)$ y $v(x, y)$ son los desplazamientos asociados a la faceta en el paso de un fotograma a otro. Los desplazamientos se obtienen identificando mediante correlación las posiciones de las facetas en la imagen inicial y en la imagen deformada (reconociendo el nivel de grises), siendo su cálculo un proceso iterativo.

El sistema da inicialmente una solución aproximada, típicamente un desplazamiento de sólido rígido sin considerar deformación, y la va corrigiendo en las sucesivas iteraciones.

El proceso termina cuando se alcanza la convergencia, tomando el coeficiente de correlación su valor mínimo.

Una vez se tiene el campo de desplazamientos en todas las facetas y para todos los fotogramas, y conocido el estado de referencia, el sistema calcula las deformaciones en la superficie de la muestra usando la teoría clásica de deformaciones y desplazamientos a partir del cálculo del gradiente de deformación y el tensor de Hencky.

