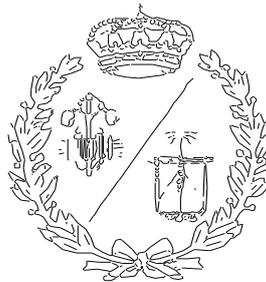


**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN**

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Proyecto / Trabajo Fin de Carrera

**Aplicación de técnicas convencionales de
caracterización mecánica para evaluar la
eficacia de fármacos en la consolidación de
huesos fracturados**

**(Traditional mechanical characterization
technics applied to asses the consolidation of
fractured bones)**

Para acceder al Título de

INGENIERO INDUSTRIAL

Aitor Zabala Septién

Julio - 2014

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar esta oportunidad que tengo de dejar constancia escrita de mi gratitud comenzando por agradecer de todo corazón el esfuerzo de todos los profesores que se han involucrado en mi aprendizaje y el de mis compañeros (tanto en la etapa universitaria como en las anteriores). Para ellos, todo mi reconocimiento y admiración. Puede que no se diga con la suficiente frecuencia, pero los alumnos estaremos eternamente agradecidos a quienes nos ayudan a expandir nuestra visión del mundo. Una vez más, gracias.

Quiero hacer una mención especial a LADICIM, y dentro del mismo, a José Antonio Casado Del Prado, Soraya Diego Cavía y Diego Ferreño Blanco. Tres años atrás y sin conocerles (puesto que nunca me habían dado clase), me inscribí en un curso de verano cuyo título me llamó la atención. Ellos eran los organizadores de ese curso, que de ahí en adelante se convirtió para mí en una referencia. Mi interés por el campo de la ingeniería que se trató en el curso citado no hizo más que aumentar desde aquel momento, hasta el punto de que mi proyecto final de carrera ha acabado versando sobre el mismo tema. A vosotros, que habéis sido una referencia y una gran ayuda, gracias.

Por último, a mi familia y amigos (que son parte de la misma). No podría explicar cuánto me ha ayudado vuestro apoyo, pero sabed que ha sido ese apoyo el que ha conseguido que llegue al fin de esta etapa de mi vida sin haberme cuestionado ni una sola vez el haberme inscrito como alumno de Ingeniería Industrial en la escuela que ha sido mi segunda casa durante estos seis años. Gracias!

3ndice

1. Memoria.....	6
1.1. Introducci3n y objetivos	7
1.2. Antecedentes.....	8
1.2.1. Estudios previos.....	8
1.2.2. El tejido 3seo.....	10
1.2.2.1. Estructura macrosc3pica de huesos largos	11
1.2.2.2. Remodelaci3n 3sea	13
1.2.2.3. Pseudoartrosis y osteotom3a de sustracci3n	15
1.3. Metodolog3a	16
1.3.1. Obtenci3n de muestras	16
1.3.1.1. Tratamiento de los animales.....	16
1.3.1.2. Monitorizaci3n de los animales.....	19
1.3.1.3. Extracci3n de los huesos	21
1.3.2. Ensayo de flexi3n en cuatro puntos	22
1.3.2.1. Preparaci3n de las muestras	22
1.3.2.2. Procedimiento de ensayo	24
1.3.3. Ensayo de ultra-micro indentaci3n	28
1.3.3.1. Preparaci3n de las muestras	28
1.3.3.2. Procedimiento de ensayo	31
1.3.4. Ensayo de impacto Charpy	36
1.3.4.1. Preparaci3n de las muestras	36
1.3.4.2. Procedimiento de ensayo	37
1.4. Resultados.....	39
1.4.1. Ensayos de flexi3n en cuatro puntos.....	39

1.4.1.1. Fuerza m3xima	39
1.4.1.2. Energ3a almacenada hasta fuerza m3xima	44
1.4.1.3. Rigidez.....	47
1.4.2. Ensayos de ultra-micro indentaci3n	48
1.4.2.1. Dureza cortical y trabecular	48
1.4.2.2. M3dulo de elasticidad	60
1.4.3. Ensayos de impacto Charpy	63
1.4.3.1. Energ3a	63
1.4.3.2. Resiliencia	66
1.5. Conclusiones	68
2. Presupuesto.....	72
3. Bibliograf3a.....	76

1. Memoria

1.1. Introducci3n y objetivos

En el marco de colaboraci3n entre la Universidad de Cantabria y la Fundaci3n Marqu3s de Valdecilla, se lleva varios a3os trabajando con el fin de conseguir comprender de forma m3s precisa el comportamiento mec3nico de materiales biol3gicos. Para ello, el Laboratorio de la Divisi3n de Ciencia e Ingenier3a de los Materiales (en adelante, LADICIM) y la Unidad de Metabolismo 3seo y Mineral (MOM) del hospital universitario Marqu3s de Valdecilla han trabajado juntos; intentando de alguna manera trasladar el conocimiento emp3rico del cuerpo humano, a par3metros con los que operar reduciendo la especulaci3n.

La caracterizaci3n de materiales biol3gicos es inherentemente compleja, debido a que no se pueden hacer ensayos en tejidos de pacientes vivos y a la gran dispersi3n de los resultados. Teniendo esto en cuenta, se trabaja bajo la premisa de que los materiales biol3gicos responden a las estimulaciones mec3nicas siguiendo los mismos principios en que se basa la caracterizaci3n de materiales inertes. La consecuencia directa de esta premisa es que se acepta que las t3cnicas de ensayo utilizadas para caracterizaci3n de materiales inertes, es v3lida tambi3n para la caracterizaci3n de materiales biol3gicos. Esta idea es extendida m3s adelante en el estudio de antecedentes.

Este proyecto aborda el comportamiento de huesos de ratas Sprague-Dawley a las que se somete a una cirug3a llamada osteotom3a de sustracci3n (simulando una circunstancia anatómica conocida como pseudoartrosis) con el objetivo de estudiar el comportamiento mec3nico del callo 3seo formado durante la curaci3n, considerando para ello el efecto de diversos medicamentos. Para evaluar esta respuesta, los huesos son sometidos a ensayos de flexi3n en cuatro puntos, ultra-micro indentaci3n e impacto (ensayos Charpy).

Hasta ahora LADICIM haba obtenido resultados muy positivos al estudiar muestras biol3gicas con los ensayos de flexi3n y ultra-micro indentaci3n, de manera que se tom3 la decisi3n de avanzar un poco m3s en estos estudios tratando de validar los ensayos de impacto Charpy como m3todo de estudio de materiales biol3gicos.

El inter3s de validar este tipo de ensayo responde al hecho de que reproduce de forma m3s realista una situaci3n en la que se presenten esfuerzos din3micos (a diferencia de los ensayos est3ticos de flexi3n e indentaci3n). Seg3n un estudio consultado, las roturas de tibias est3n causadas en un 99'8% de los casos por situaciones en las que hubo impactos sobre la pierna [1]. De esto se deduce que, si bien los ensayos est3ticos son tremendamente 3tiles para hallar algunas de las propiedades del material, los ensayos de impacto (en caso de ser validados) nos dar3n una perspectiva m3s realista de cu3l es el comportamiento del hueso en el momento en el que se produzca una rotura.

En lo referente al estudio de huesos sometidos a la osteotom3a de sustracci3n, su motivaci3n se justifica en el subapartado "pseudoartrosis y osteotom3a de sustracci3n" (dentro del punto 1.2.2.).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Estudios previos

LADICIM ha llevado a cabo una serie de estudios que han conducido a este proyecto final de carrera. Para llegar a este punto, se deb3a demostrar en primer lugar que los m3todos de an3lisis utilizados para materiales inertes, son v3lidos tambi3n para materiales biol3gicos. Esto supon3a un reto, puesto que las muestras de los materiales a ensayar (huesos de ratas en su mayor3a) tienen unas dimensiones mucho m3s reducidas que las probetas habitualmente utilizadas en el laboratorio. Adem3s, la geometr3a es compleja; hecho que conlleva una dificultad a3adida a la hora de mantener

la estabilidad de la muestra durante el ensayo. Adem3s, los resultados suelen ofrecer grandes dispersiones debido a lo heterog3neo de las muestras, por su componente gen3tica; lo que supone una dificultad a3adida.

Por estas razones, los primeros pasos que se dieron fueron en la direcci3n de tratar de conseguir formas de ensayar las muestras, de manera que los ensayos pudieran ser considerados equivalentes a los usados en materiales inertes, dando lugar a resultados comparables entre s3. Este estudio dio lugar al dise3o de los utillajes necesarios para hacer los ensayos de caracterizaci3n.

Una vez los utillajes fueron validados, se pas3 a estudiar si los resultados ofrecidos por los ensayos pod3an ser considerados v3lidos. Para ello se llev3 a cabo un amplio estudio en el que se utilizaron 30 ratas que cumpl3an con una serie de caracter3sticas comunes (hembras, peso comprendido entre 250 y 350 gramos y de edades similares), con el fin de tener una poblaci3n de estudio suficiente para el an3lisis a la vez que se trataba de disminuir la dispersi3n. Se hicieron cinco grupos de estudio sometidos a distintos tratamientos:

- Un grupo de control
- Un grupo con osteoporosis inducida y sin tratar
- Un grupo con osteoporosis inducida tratada con f3rmaco 1
- Un grupo con osteoporosis inducida tratada con f3rmaco 2
- Un grupo con osteoporosis inducida tratada con ambos f3rmacos

Se hicieron ensayos de flexi3n de los fustes de las tibias, los f3mures y los h3meros; as3 como ensayos de nanoindentaci3n de los mismos, distinguiendo entre hueso cortical y trabecular. El an3lisis de los resultados de esos ensayos llev3 a la conclusi3n de que este tipo de ensayos, propios de materiales inertes, resulta v3lido para el estudio de materiales biol3gicos y como m3todo para evaluar el efecto comparativo de medicamentos.

1.2.2. El tejido 3seo

El hueso es un tejido conjuntivo r3gido e inflexible en el que la matriz extracelular se ha impregnado de sales de calcio y fosfato en un proceso denominado mineralizaci3n. Las funciones del hueso son: el soporte y protecci3n del cuerpo y sus 3rganos, y el actuar como reservorio para los iones de calcio y fosfato [2]. La funci3n que buscamos estudiar es la primera.

Como todos los dem3s tejidos conectivos, el hueso se compone de c3lulas y una matriz intercelular en la que est3n embebidas la gran mayor3a de sus c3lulas (osteocitos). Aunque existen diferencias entre huesos, estos est3n generalmente constituidos por un 25% de agua, un 40 % de minerales (sales inorg3nicas ricas en calcio y fosfato) y un 35 % de material org3nico en el que destaca el col3geno [3].

Seg3n sus dimensiones, los huesos pueden ser clasificados en:

- Huesos largos: En ellos se distingue un cuerpo (o di3fisis) y dos extremidades. El crecimiento se hace, predominantemente en una direcci3n.
- Huesos planos: Compuestos por dos l3minas compactas entre las que se dispone material esponjoso. Crecen en dos direcciones.
- Huesos cortos: Formados por tejido esponjoso, rodeado de una cubierta compacta.
- Huesos irregulares: Comprende huesos que no pueden ser comprendidos en los grupos anteriores.
- Huesos neum3ticos: Poseen cavidades tapizadas de mucosa que contienen aire. Se encuentran en el cr3neo.

- Huesos sesamoides: Se trata de un hueso incrustado en un tend3n, p. ej.: la r3tula [4].

En este proyecto se estudian 3nicamente huesos largos, debido a que son los que presentan la geometr3a m3s propicia para la realizaci3n de estudios de impacto y, sobre todo, a que son huesos que se rompen, en la mayor3a de los casos, en plena actividad y como consecuencia de acciones violentas aplicadas sobre la extremidad [5].

1.2.2.1. Estructura macrosc3pica de huesos largos

Como se ha mencionado anteriormente, en los huesos largos pueden distinguirse con facilidad un cuerpo central (conocido como di3fisis) y unas extremidades (ep3fisis). La di3fisis est3 constituida por hueso compacto (o cortical) que forma un cilindro hueco con un espacio medular central llamado cavidad medular, mientras que la ep3fisis est3 formada por hueso esponjoso (o trabecular); las diferencias entre estos tipos de huesos se explican m3s adelante. Los huesos se encuentran mayoritariamente recubiertos (salvo en las superficies articulares y en los lugares de inserci3n de tendones y ligamentos) de una capa de tejido conjuntivo con capacidad osteog3nica llamada periostio. La cavidad medular de la di3fisis y los espacios dentro del hueso esponjoso est3n revestidos por endostio, que tiene tambi3n capacidad osteog3nica (requerida para que pueda darse el proceso de remodelaci3n 3sea que se explica m3s adelante) [6].

- Hueso cortical

Est3 formado por columnas 3seas paralelas se disponen siguiendo el eje mayor (en los huesos largos), es decir, las l3neas de tensi3n a que el hueso est3 sometido. Estas columnas constan de capas 3seas conc3ntricas dispuestas alrededor de un canal central que contiene vasos sangu3neos, linf3ticos y nervios.

- Hueso trabecular

Formado por una red de trab3culas 3seas separadas por espacios laber3nticos comunicantes que contienen la m3dula 3sea. Las trab3culas son finas y est3n formadas por laminillas irregulares de hueso con lagunas en las que se encuentran los osteocitos.

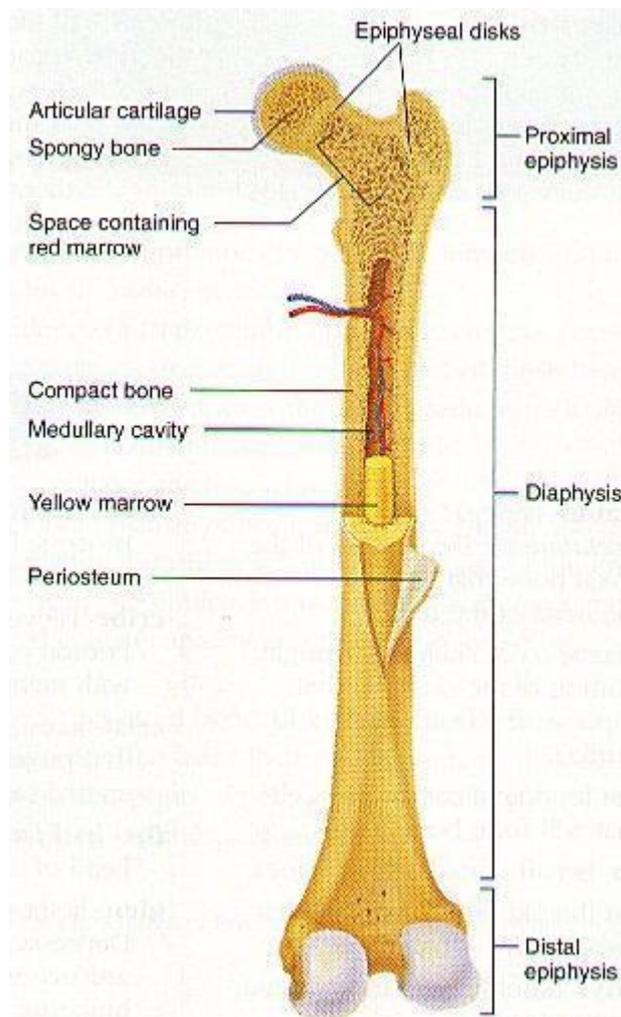


Figura 1 - Estructura macrosc3pica de un f3mur [7]

1.2.2.2. Remodelación ósea

Es importante entender que los huesos no son estructuras estáticas. Al contrario, están cambiando continuamente (no sólo en la infancia con su crecimiento). Para entender el proceso de remodelación ósea es necesario conocer dos tipos de células que participan en el mismo: los osteoclastos y los osteoblastos.

Los osteoclastos son las células responsables de la reabsorción del hueso. En la cara del osteoclasto que se apoya sobre la matriz ósea, se produce una reducción del pH que hace que el mineral se disuelva. Tras la disolución de la parte mineral y mediante la actuación de enzimas, se degrada la componente; con lo que la reabsorción queda completa. Este proceso se da a una velocidad de decenas de micras por día. Una vez la reabsorción se ha completado, los osteoclastos mueren

Los osteoblastos por su parte son las células que forman el nuevo hueso. Su función principal es la de segregar las proteínas que forman la matriz orgánica. Estas proteínas se apoyan sobre una superficie de hueso antiguo, dando lugar al osteoide. Éste contiene colágeno, proteínas, proteoglicanos y agua, pero no mineral (que será adquirido una vez haya terminado el proceso de formación). El crecimiento del hueso debido a la actuación de osteoblastos se da a una velocidad de un micra diario aproximadamente.

Hay un último tipo de célula llamada osteocito. Los osteocitos son osteoblastos que han quedado atrapados en la matriz ósea, dejando de cumplir con sus funciones de formación de hueso para convertirse en células que se comunican entre sí, trasladando información sobre posibles roturas, por ejemplo. Hay que tener en cuenta que, si bien el 70% de la remodelación es aleatorio como “mantenimiento” de nuestro sistema óseo, un 30% está dirigida a reparar microfracturas, y ahí es donde entra en juego la comunicación entre osteocitos.

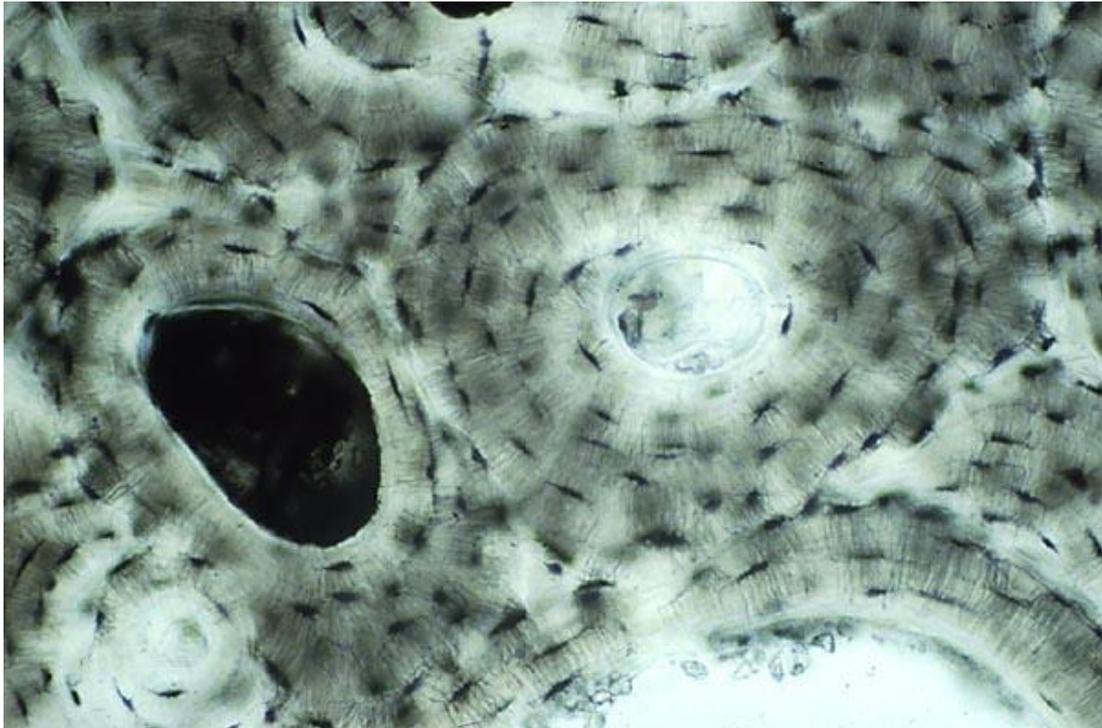


Figura 2 - Corte horizontal de un hueso largo. Los husos negros son osteocitos. [8]

Las distintas etapas de la remodelaci3n son:

- **Activaci3n:** Esta fase comienza con el reclutamiento de pre-osteoclastos, que se diferencian y fusionan dando lugar a osteoclastos maduros. No se conoce bien el desencadenante de la fase de activaci3n, pero se cree que puede estar ligada a par3metros mec3nicos, endocrinol3gicos y a otros par3metros propios de la estructura 3sea (como el envejecimiento o sufrimiento de alg3n da1o).
- **Resorci3n:** Durante esta fase, los osteoclastos se fijan al hueso que va a ser renovado para disolverlo. El remanente de hueso es absorbido por el propio osteoclasto hasta que llega al l3mite de la zona que va a ser renovada. Una vez alcanzada esta zona los osteoclastos desaparecen por apoptosis.
- **Inversi3n:** Esta es una fase de aparente inactividad durante la cual se desencadenan las se1ales que reclutan a los osteoblastos que terminar3n por formar el hueso.

- **Formaci3n:** Durante esta etapa, los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz osteoide, que se mineralizar3 posteriormente. Como ya se ha dicho, la formaci3n de osteocitos es consecuencia de que hay osteoblastos que quedan atrapados en la matriz que se va depositando. Se calcula que aproximadamente la mitad de los osteoblastos que forman la matriz inicialmente acaban convirti3ndose en osteocitos. El resto puede terminar convirti3ndose en c3lula de borde o bien puede morir por apoptosis.

1.2.2.3. Pseudoartrosis y osteotom3a de sustracci3n

La pseudoartrosis es una complicaci3n de las fracturas que se enmarca dentro de las que se consideran tard3as. Se denomina pseudoartrosis a la falta total de consolidaci3n de una fractura, que da lugar a la formaci3n de una falsa articulaci3n a nivel del foco de la fractura. Desde un punto de vista cl3nico, si a las 9 meses de que se produjera la lesi3n persiste movilidad en el hueso, se considera que se est3 ante un caso de pseudoartrosis. En el desarrollo de la pseudoartrosis influyen factores generales (no relativos a la lesi3n o h3bitos del paciente), locales (derivados de las complicaciones propias de la lesi3n en concreto y de la forma en que el paciente reacciona a la misma) y debidos al tratamiento.

Si bien la pseudoartrosis tiene una tasa de incidencia del 3-4% sobre el total de fracturas que se tratan, no debemos caer en el error de pensar que su importancia es peque1a. Los casos de pseudoartrosis tienen consecuencias muy graves para los pacientes que las experimentan (llegando a la necrosis del tejido perif3rico, que puede conducir en 3ltima instancia a la necesidad de sustituir parte del tejido 3seo por un implante), lo que hace b3sico el conocer a fondo la mec3nica del hueso tanto sano como afectado; y de la misma manera, de los f3rmacos que se pueden emplear para evitar que esta condici3n se produzca.

En este estudio, la pseudoartrosis de los f3mures de las ratas se ha simulado mediante un procedimiento conocido como osteotom3a de

sustracci3n. Este m3todo consiste en el sometimiento del animal a una intervenci3n quir3rgica en la que parte de la diáfisis del hueso es retirada (en este estudio se ha buscado obtener una separaci3n entre las partes restantes del f3mur de 2 mm). Una vez ese trozo de hueso es retirado, se introduce un tornillo por la cabeza inferior del f3mur en sentido axial. La funci3n de este tornillo es la de impedir que las partes superior e inferior del hueso se acerquen m3s de lo deseado (o entren en contacto en 3ltima instancia), de manera que se pueda simular correctamente una situaci3n de pseudoartrosis [9].

1.3. Metodolog3a

En este apartado se explican los procedimientos que se llevaron a cabo y se presenta el equipo que fue utilizado para la realizaci3n de los ensayos. Tambi3n se explica el procedimiento seguido para la obtenci3n de las muestras, debido a su naturaleza biol3gica.

1.3.1. Obtenci3n de muestras

1.3.1.1. Tratamiento de los animales

Para la obtenci3n de los resultados, 12 ratas Sprague-Dawley (todas hembras) fueron criadas en condiciones id3nticas, en t3rminos de dieta, temperatura y humedad. Las ratas fueron aleatoriamente divididas en cuatro grupos a cada uno de los cuales se asign3 un procedimiento quir3rgico y un tratamiento espec3fico. Los tratamientos proporcionados a las ratas se basaron en su peso y sus dosis espec3ficas pueden ser consultadas en el ap3ndice.

El estudio se divide en cuatro partes, cada una de las cuales involucra a cuatro ratas. Las fases son consecutivas en el tiempo en intervalos de tres

meses, que es a su vez el tiempo que se tard3 en obtener cada grupo de muestras. De cada rata se obtienen 4 muestras: los f3mures y tibias derechas e izquierdas, que son preparadas y conservadas para la futura realizaci3n de los ensayos biomec3nicos.

Las ratas son sometidas a una intervenci3n quir3rgica a los seis meses de vida, aproximadamente. La edad media de las ratas Sprague Dawley es de unos 2.5-3.5 a3os, pero a los seis meses el animal ha alcanzado su tama3o adulto y plena madurez. Cuando el periodo de tratamiento de doce semanas acaba, las ratas son sacrificadas para la extracci3n de los huesos. El sacrificio de las ratas se hizo siguiendo el procedimiento 3tico propio del sacrificio de animales empleados para la experimentaci3n.

Como ya se ha dicho, las ratas fueron divididas en cuatro grupos: fractura normal, grupo de control, f3rmaco 1 y f3rmaco 2. La nomenclatura utilizada para referirse a cada uno de estos grupos se presenta a continuaci3n.

Descripci3n del grupo	Nomenclatura	Nombre del grupo
Fractura normal con suero fisiol3gico	F+S	Fractura normal
Osteotom3a de substracci3n con suero fisiol3gico	OS+S	Grupo de control
Osteotom3a de substracci3n con f3rmaco 1	OS+F1	F3rmaco 1
Osteotom3a de substracci3n con f3rmaco 2	OS+F2	F3rmaco 2

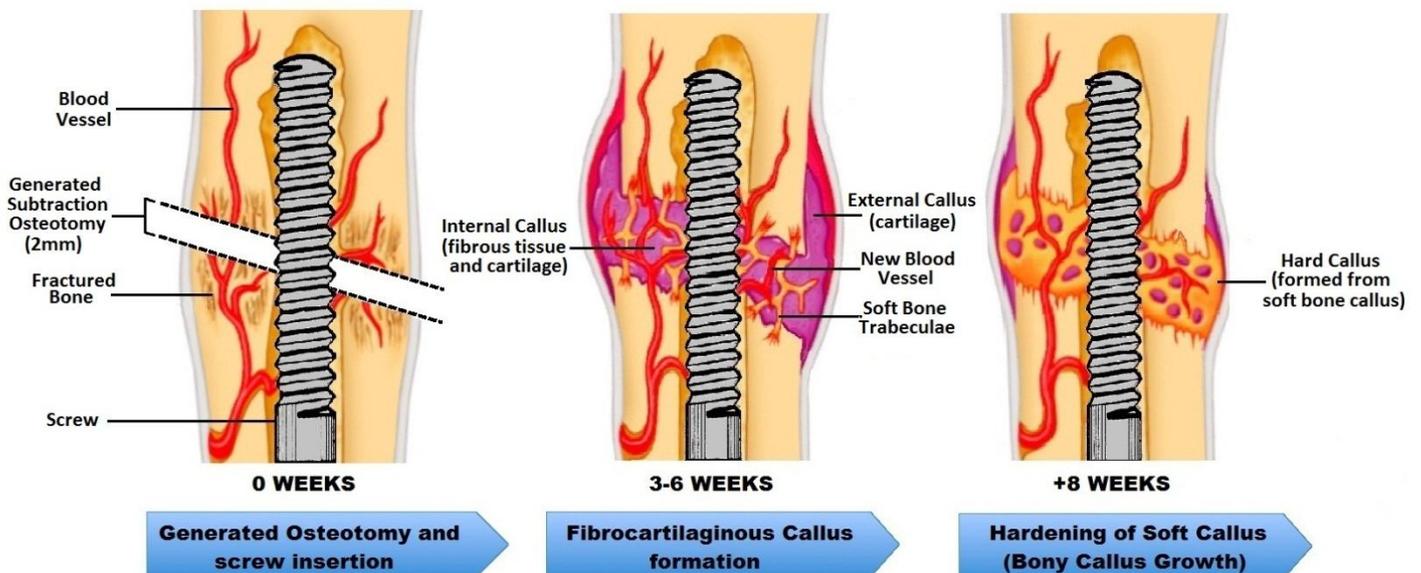
La aplicaci3n de suero fisiol3gico tiene su raz3n de ser en que act3a como placebo, puesto que todas las ratas deben estar sometidas a condiciones de estr3s semejantes y por lo tanto todas deben ser inyectadas.

El procedimiento llevado a cabo fue el mismo para los grupos OS+S, OS+F1 y OS+F2. En la figura siguiente, se recoge un diagrama que representa la progresi3n de acontecimientos que ocurre en el f3mur

(intervenci3n y te3rica evoluci3n del tejido). A las ratas del grupo F+S se les somet3a a una intervenci3n similar, pero no hab3a extracci3n de tejido 3seo puesto que se quer3a simular una fractura simple.

La intervenci3n consiste en la realizaci3n de una incisi3n que da acceso al hueso para poder extraer despu3s un trozo del f3mur de dos mil3metros de espesor. Este procedimiento se conoce como osteotom3a de sustracci3n. Una vez la separaci3n de dos mil3metros hab3a sido hecha, y con la intenci3n de que este "hueco" se mantuviera en el tiempo; se introduc3a un tornillo por el extremo inferior del f3mur derecho de la rata. Los tornillos empleados fueron adquiridos a Traor Norte y su tama3o era de 2 mm x 24mm.

Para tener la certeza de que el callo 3seo se formaba correctamente durante el tratamiento, las ratas fueron monitorizadas a intervalos regulares.



Siegel, P. (2012). *ANAT 416: Development, Disease and Regeneration, Lecture: Bone Remodeling and Fracture Repair*. [Class handout]. Retrieved from <https://shibboleth.mcgill.ca/idp/Authn/UserPassword>
 Palmer, C. I. (1949). *Library of Practical Electricity: Practical Mathematics For Home Study*. New York: McGraw-Hill.

Figura 3 - Diagrama del proceso de curaci3n durante el tratamiento

1.3.1.2. Monitorizaci3n de los animales

La monitorizaci3n es muy importante, pues sirve para detectar complicaciones en las primeras etapas del tratamiento; pero adem3s, la monitorizaci3n tiene el prop3sito a3adido de servir como herramienta para comprobar que la separaci3n de las partes superior e inferior del f3mur se mantiene. Para conseguir esto, se toman im3genes peri3dicas del f3mur derecho mediante el uso de rayos X. Para la obtenci3n de la imagen es necesario que la rata est3 quieta, de manera que los animales son anestesiados antes. La primera imagen se toma a los siete d3as de la intervenci3n, para comprobar que 3sta ha tenido 3xito y que no hay complicaciones. A las seis semanas se lleva a cabo otra prueba de rayos X como comprobaci3n de que el callo se est3 formando correctamente y que la separaci3n se mantiene. Por 3ltimo, la decimosegunda semana se hace una 3ltima prueba antes del sacrificio. En las tres ocasiones, se toman im3genes desde dos 3ngulos: lateral y antero-posterior. A continuaci3n se presenta un ejemplo de las im3genes tomadas.



Figura 4 - Placa antero-posterior del f3mur derecho previa al sacrificio

Los resultados de las pruebas de rayos X se guardan como un archivo de imagen que es posteriormente analizado en AutoCAD (medir la distancia entre partes superior e inferior y evoluci3n de la misma a lo largo del tratamiento).

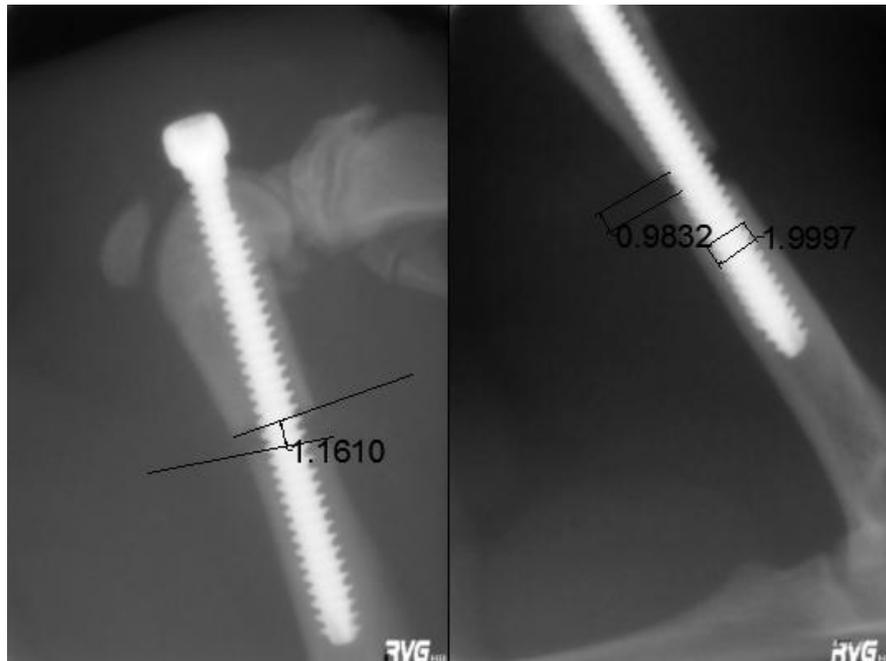


Figura 5 - Medici3n de la separaci3n en dos muestras distintas: a) vista lateral, b) vista antero-posterior

Como se muestra en la figura anterior, se emplea AutoCAD para medir la separaci3n media del f3mur. Puede apreciarse que en la foto b) tambi3n se ha medido el tornillo para verificar que la escala empleada es la correcta y asegurar la precisi3n de las mediciones. El tama1o de estas separaciones se recogi3o como dato para poder emplearlo posteriormente en un diagrama de comparaci3n de fuerzas m3ximas frente a tama1o de la separaci3n.

Una vez se ha hecho la 3ltima placa de los f3mures, se procede a la extracci3n de los huesos.

1.3.1.3. Extracci3n de los huesos

Los huesos de las ratas deben ser extra3dos de sus cuerpos para poder llevar a cabo los experimentos. El procedimiento seguido consisti3 en la anestesia subcut3nea de la rata mediante una mezcla de ketamina y medetomidina, tras lo cual las ratas fueron sacrificadas mediante la inhalaci3n de CO₂.

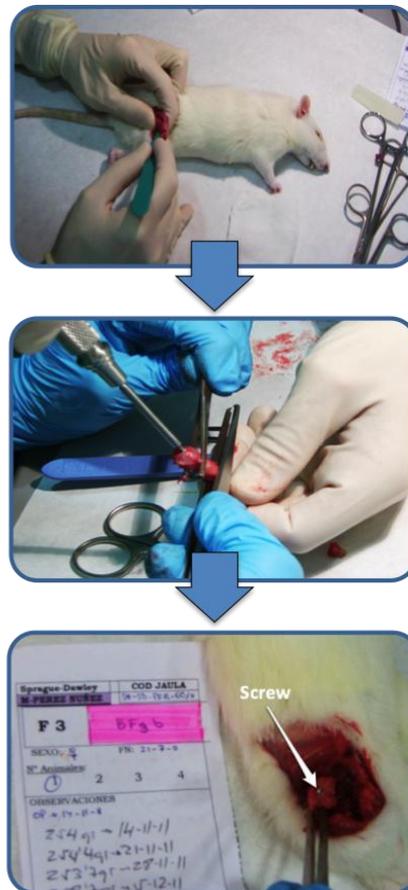


Figura 6 - Proceso de extracci3n de un f3mur

Los huesos fueron extra3dos mediante un procedimiento quir3rgico llevado a cabo por personal m3dico.

En primer lugar, se realiza una incisi3n en la piel utilizando un escalpelo. Una vez el hueso ha sido localizado, se cortan los m3sculos y ligamentos que lo rodean; tras lo cual el f3mur y la tibia son separados de los elementos anatómicos que los rodean (cadera y peron3). Con el hueso fuera del cadáver, lo 3nico que queda por hacer es retirar el exceso de tejido y cart3lago. La tibia queda as3 lista para ser ensayada, pero el f3mur lleva asociado un procedimiento adicional.

Como se aprecia en la segunda foto del collage que precede a estos p3rrafos, el tornillo debe ser extra3do del f3mur derecho. Para ello se utiliza un destornillador especialmente dise1ado para la operaci3n. 3sta es la parte m3s dif3cil del procedimiento de obtenci3n de las muestras, ya que el callo normalmente crece alrededor del tornillo y dificulta la extracci3n.

En la tercera foto puede verse la cabeza del tornillo a3n dentro de la rata junto con la hoja de datos de la rata. Durante todo el proceso se puso especial cuidado en que todas las ratas fueran etiquetadas correctamente, pues errores de ese tipo pueden conducir a errores importantes a la hora de analizar los resultados.

Hay que tener en cuenta que la extracci3n de los huesos y su ensayo no se produjeron de forma consecutiva, con lo cual los huesos deb3an ser conservados en soluci3n salina para evitar que se secan. Esta soluci3n salina que conten3a el hueso era despu3s situada en un contenedor herm3ticamente sellado que se manten3a a 4° C hasta el momento en que el hueso era ensayado.

1.3.2. Ensayo de flexi3n en cuatro puntos

1.3.2.1. Preparaci3n de las muestras

Una vez los huesos son extra3dos, se limpian con la intenci3n de eliminar cualquier exceso de cart3lagos, ligamentos o tejido muscular que

hayan podido quedar. Los ensayos de flexi3n en cuatro puntos fueron llevados a cabo en la di3fisis de los f3mures, usando para ello una m3quina Servosis ME-405/1 con una c3lula de carga de 1250 N. La imagen que sigue a continuaci3n deja ver el procedimiento seguido para eliminar los extremos de los f3mures. Para ello, se utilizaron una sierra, una pinza mec3nica y una cobertura para proteger al hueso de cualquier da1o que pudiera afectar a los resultados. Es muy importante poner un gran cuidado a la hora de manejar las muestras (especialmente los f3mures derechos), pues son fr3giles y da1arlas podr3a invalidarlas para el estudio.



Figura 7 - Obtenci3n de la cabeza superior de un f3mur durante la preparaci3n de muestras

Una vez se ha limpiado el hueso y se han separado los extremos superior e inferior, el aspecto que presentan las muestras es el siguiente.



Figura 8 - Muestra preparada para la realización del ensayo de flexión

En la foto se aprecia una regla graduada para poder tener una idea del tamaño de las muestras. Además, cada muestra está nombrada con la nomenclatura que se empleó para identificarlas antes de ser ensayadas. Los extremos (también llamados cabezas) se guardaban en contenedores marcados hasta el momento en que se hacían los ensayos de ultra-micro indentación.

Para obtener unos resultados que se acercaran a la realidad, los ensayos se realizaron, por lo general, en las 24 horas que siguieron a la extracción. Antes de realizar el ensayo, la temperatura de los huesos se elevaba hasta alcanzar los 37° C. Para conseguir esto, el hueso era sumergido en una solución salina cuya temperatura se mantenía constante mediante el uso de una bañera de agua digital (Shel Lab Digital H₂O). El objetivo de esta operación es simular las condiciones en las que se encuentra el hueso en el cuerpo del animal.

1.3.2.2. Procedimiento de ensayo

El equipo debe ser preparado antes de ejecutar los ensayos. Los principales pasos de la preparación del ensayo son los siguientes:

1. Montar los componentes de la m3quina (brazo con actuador y sistema de medida)
2. Montar el soporte de la muestra y el contenedor (contenedor de metacrilato y puntos de presi3n)
3. Montar el calentador y la conducci3n de agua (ba3o de agua, bomba y calibrar la temperatura)
4. Calibrar el sistema de recogida de datos (formato de los datos y par3metros)

Una vez se han completado los pasos mencionados, se puede proceder a la realizaci3n de los ensayos. Se colocaba la muestra en el contenedor de metacrilato y se iniciaba un ba3o de agua a 37° C. Mediante la ayuda de una bomba, se manten3a un flujo de agua caliente en torno a la muestra, recreando las condiciones *in vivo*. En la foto que sigue se observan los principales elementos del ensayo.



Figura 9 - Instalaci3n empleada en la realizaci3n del ensayo de flexi3n en cuatro puntos

El ensayo de flexión en cuatro puntos es importante en el estudio biomecánico de los huesos, puesto que permite la aplicación de una carga de flexión, simulando así las condiciones en las que la diáfisis de los fémures suele romperse. Durante el ensayo, la carga era aplicada mediante un pistón hidráulico, a través de dos puntos que entraban en contacto con el hueso. La muestra era apoyada sobre dos cilindros metálicos, separados 15 milímetros entre sí. La carga era aplicada a velocidad constante hasta que los dos puntos del brazo hidráulico entraban en contacto con la superficie del hueso. En la figura que sigue, se ve el actuador antes de que entre en contacto con la muestra. F representa la fuerza aplicada por el actuador. Tanto esta fuerza como el desplazamiento eran medidas por un sistema informatizado acoplado a la máquina.

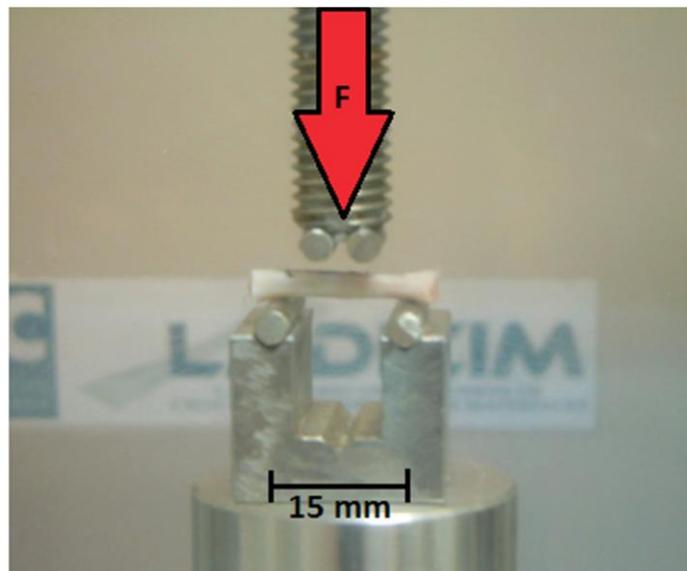


Figura 10 - Un fémur izquierdo a punto de ser ensayado

La muestra actúa como una viga en este ensayo. La parte superior trabaja a compresión, mientras que la inferior trabaja a tracción. En la figura anterior se aprecian los cuatro puntos que dan nombre al ensayo (cilindros metálicos).

A partir de los datos recogidos durante los ensayos y mediante el uso de Excel, tambi3n se obtuvieron las gr3ficas de fuerza-desplazamiento. Mediante estas gr3ficas se obtienen tres propiedades mec3nicas: fuerza m3xima (F_{max}), energ3a absorbida hasta fuerza m3ximas (E_a) y rigidez. A continuaci3n se muestra un ejemplo de curva fuerza-desplazamiento est3andar obtenida en el ensayo de flexi3n en cuatro puntos.

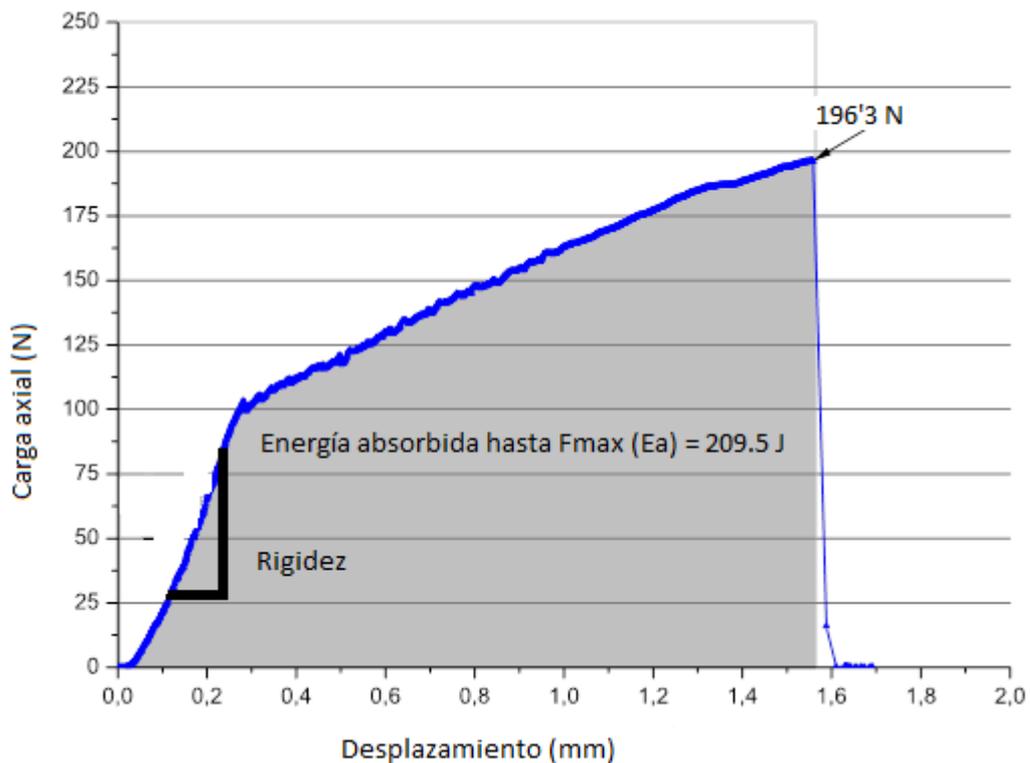


Figura 11 – Gr3fica que fuerza-desplazamiento t3pica

De cada ensayo realizado, se obtiene una gr3fica fuerza-desplazamiento asociada a cada f3mur obtenido. Los tres par3metros calculados se presentan en la gr3fica anterior. La fuerza m3xima est3 se3alada mediante una flecha sobre el punto de fuerza m3xima. En este caso, la fuerza m3xima coincide con el punto de fractura. F_{max} es la fuerza m3xima que pueden soportar las muestras, y por lo tanto es simplemente una carga axial medida en newtons (N). Se ha medido la fuerza m3xima de

cada muestra y con la intenci3n de poder aportar un valor preciso de este par3metro, se ha hecho la media de los valores obtenidos durante las cuatro fases.

La energ3a absorbida hasta fuerza m3xima es el 3rea sombreada en gris sobre la gr3fica. Se trata del 3rea comprendida entre el eje X y la gr3fica, desde el origen hasta el punto en el que se obtiene la F_{max} . La energ3a absorbida se mide en julios (J).

La rigidez se obtiene de calcular la pendiente de la curva fuerza-desplazamiento en su r3gimen lineal (zona el3stica). Como se aprecia en la gr3fica, esta zona corresponde a la parte inicial de la misma. La rigidez ha sido medida en $N \cdot mm^{-1}$.

1.3.3. Ensayo de ultra-micro indentaci3n

1.3.3.1. Preparaci3n de las muestras

En primer lugar, las cabezas de los f3mures son sumergidas en una resina acr3lica de dos componentes (Viafix liquid y Viafix poder, adquiridos a Struers). Esta operaci3n tiene su raz3n de ser en el hecho de que las muestras necesitan un soporte con geometr3a apta para la realizaci3n del ensayo. Para ello, se requiere una base que pueda ser pulida y despu3s colocada en la m3quina de ensayo. Se muestra una foto de las muestras en la resina.



Figura 12 - Inmersi3n de las cabezas de los f3mures en las resinas

Una vez las muestras est3n completamente recubiertas por la resina, 3sta se pule hasta que se obtiene una superficie uniforme que se pueda analizar en la m3quina. El proceso de pulido no es constante, ya que est3 supeditado al espesor y la consistencia de la resina.

Una pulidora autom3tica de la marca Struers (figura siguiente) fue la empleada para pulir las superficies de la resina. El molino fija la muestra mediante la generaci3n de una depresi3n, y un disco que gira a 150 rpm pule la superficie. La m3quina utiliza agua como lubricante.



Figura 13 - Pulidora de muestras embutidas

El pulido es progresivo, por ello se usaron cuatro tipos distintos de papel recubierto de carburo de silicio para pulir las muestras. Los discos de pulir fueron adquiridos a Struers y ten3a los tama3os de grano siguientes: 500, 1200, 2400 y 4000. En la foto que sigue se muestran los discos empleados.



Figura 14 - Muestras de algunos de los discos de carbonato de silicio empleados

Por 3ltimo, se usaba un disco de terciopelo para obtener un acabado suave antes de examinar las muestras. Es importante asegurarse de que las muestras tienen el acabado adecuado, pues la precisi3n de los resultados depende de que este proceso se haya llevado a cabo correctamente. A continuaci3n se muestra una foto con las muestras ya pulidas.



Figura 15 - Muestras pulidas

Una vez el proceso de pulido hab3a sido terminado, las muestras se guardaban en una soluci3n salina a 5°C, con la intenci3n de que la superficie pulida no se deteriorara. En el momento en que se iban a realizar los ensayos, las muestras se precalentaban a 37°C en una ba3o por soluci3n salina controlado de forma digital, de manera que se reprodujesen las condiciones *in vivo*.

1.3.3.2. Procedimiento de ensayo

Los ensayos se llevaron a cabo mediante el uso de una m3quina Shimadzu DUH-211 y un indentador piramidal Berkovitch. El test consiste en un proceso de carga hasta alcanzar los 150 mN y la posterior descarga.

Despu3s de cada una de estas fases sigue un periodo de reposo durante el que la carga se mantiene constante. El periodo de reposo tras la carga es de diez segundos, mientras que tras la descarga es de cinco. La velocidad de carga y descarga es la misma: 2'6648 mN/s. A continuaci3n se presenta una gr3fica est3ndar para este ensayo.

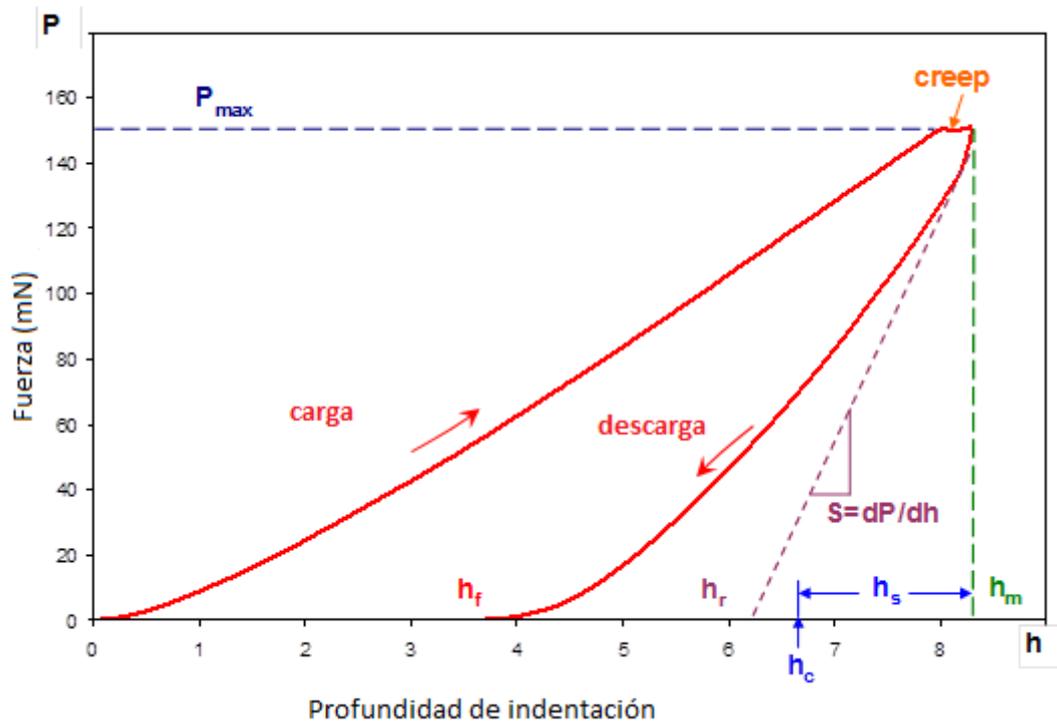


Figura 16 - Gr3fica habitual obtenida en los ensayos UMI

En la gr3fica anterior, se ven claramente las fases de carga (load) y descarga (unload). h_f , h_r , h_s , h_c y h_m representan distintos valores de profundidad de indentaci3n que se dan a lo largo del ensayo y que son representativos. La l3nea discontinua morada, cuya pendiente es S , se emplea en el c3lculo del m3dulo el3stico de indentaci3n.

En cada cabeza de cada f3mur se deben analizar tanto el hueso cortical como el trabecular. Para cada uno de los tipos de hueso se realizaron catorce ensayos de indentaci3n, con el objetivo de obtener valores de dureza y m3dulo de elasticidad. En la foto que sigue se puede ver

la m3quina de ultra-micro indentaci3n en pleno ensayo a una de las muestras de hueso.

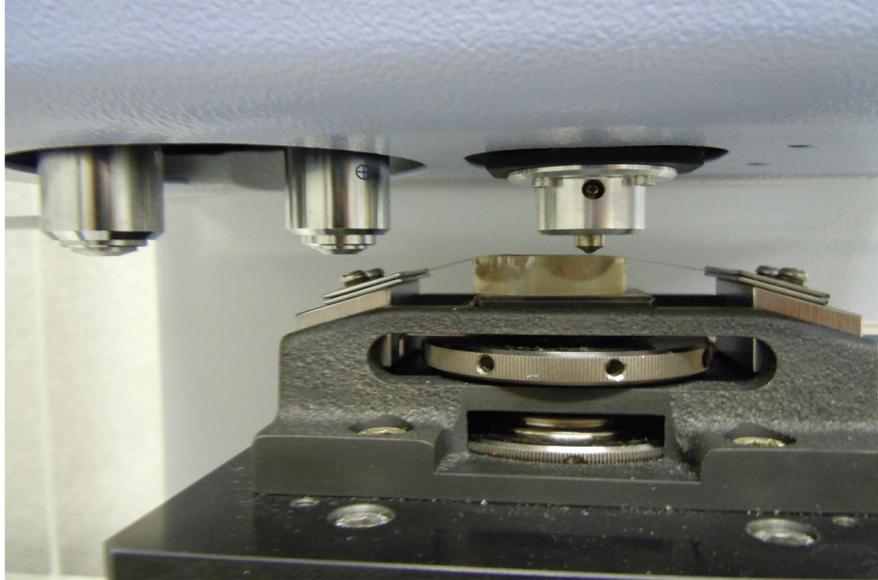


Figura 17 - Ejemplo de un ensayo de indentaci3n

La lectura de resultado se llev3 a cabo mediante el uso del software de la m3quina de indentaci3n. Los datos eran exportados a un ordenador y posteriormente analizados usando el programa Origin.

La dureza calculada en estos ensayos queda definida como la relaci3n entre la fuerza aplicada por el indentador y el 3rea proyectada por el mismo. El indentador empleado para llevar a cabo estos ensayos fue de tipo Berkovich. A continuaci3n se incluye una foto con la geometr3a del indentador.

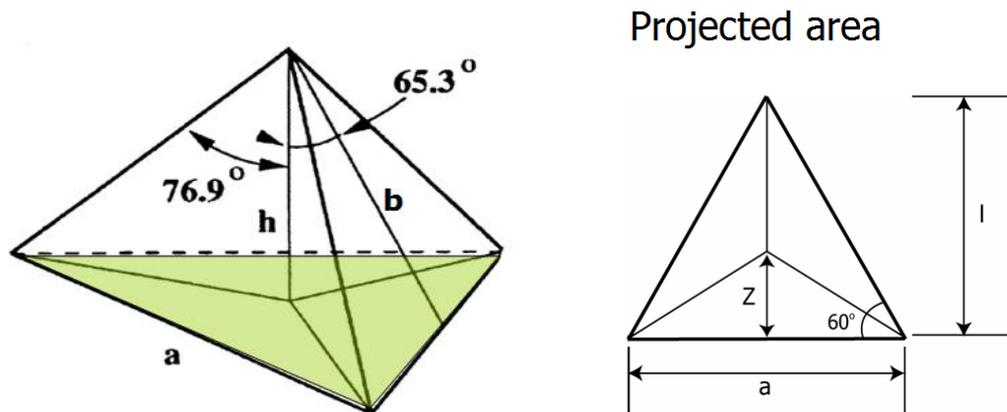


Figura 18 - Esquema de la geometr3a de un indentador Berkovich

El 3rea proyectada por el indentador se calcul3 midiendo las alturas del tri3ngulo y tomando la media. El software permit3a una lectura manual de las longitudes de los lados para obtener un valor de las alturas. En la figura que sigue se visualizan las tres alturas cuya media se hizo para obtener el valor con el que calcular el 3rea.

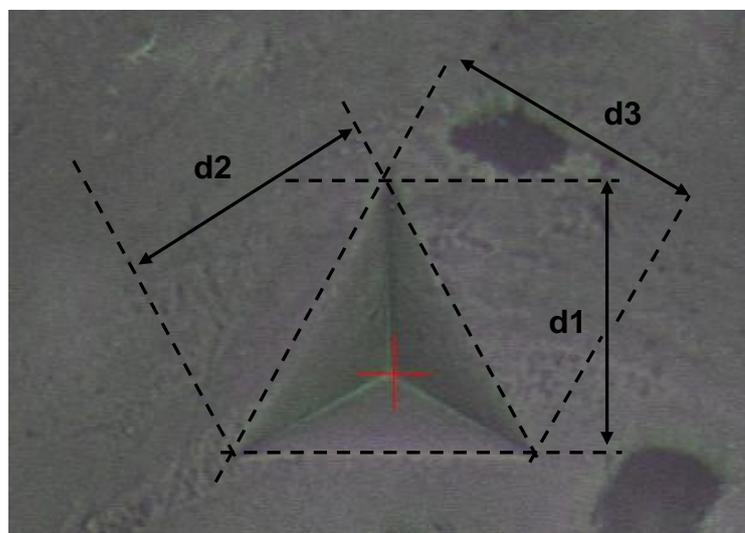


Figura 19 - Huella obtenida tras un ensayo con indicaci3n de las dimensiones a medir

Una vez se tiene el valor medio de las alturas, se aplica la siguiente f3rmula para calcular el valor de la dureza:

$$HT_{115} = \frac{160.07 \times P_{max}}{d^2}$$

Donde H_{t15} es el valor de dureza calculado por el software de la m3quina, P_{max} es la fuerza m3xima y d es la media de las alturas de la proyecci3n de la indentaci3n.

Los ensayos de ultra-micro indentaci3n tambi3n permiten calcular el valor del m3dulo el3stico de indentaci3n. El valor de este m3dulo difiere ligeramente del valor del m3dulo el3stico habitual (obtenido por ejemplo en un ensayo de tracci3n), puesto que es calculado bas3ndose en la pendiente de la tangente a la curva en la fase de descarga. Esta recta corta el eje x en el valor h_r . El m3dulo el3stico se obtiene aplicando la relaci3n de Sneddon, que relaciona el m3dulo el3stico reducido y la rigidez del material. Para nuestro caso de estudio (indentador s3lido sobre una muestra), la f3rmula a emplear es la siguiente:

$$S = 2\beta \sqrt{\frac{A}{\pi}} E_r$$

Donde S es la rigidez de la muestra, A el 3rea de contacto, E_r el m3dulo el3stico reducido y β es una constante que depende del tipo de indentador ($\beta=1.034$ en nuestro caso).

La rigidez S se obtiene de la pendiente de la recta discontinua de la gr3fica anterior, mientras que el m3dulo el3stico reducido se obtiene de la resoluci3n de la ecuaci3n que sigue, que tiene en cuenta las deformaciones del indentador y el material ensayado:

$$E_r = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

Donde E y ν son el m3dulo el3stico y el coeficiente de Poisson del material; y E_i y ν_i , son el m3dulo el3stico y coeficiente de Poisson del indentador. Los valores empleados para el c3lculo fueron: $E_i = 1141$ GPa y $\nu_i = 0.07$.

Se tom3 un valor de ν igual a 0.25 para el c3lculo del m3dulo el3stico del ultra-micro indentador, que se emple3 para deducir el m3dulo el3stico de indentaci3n, a partir de la siguiente f3rmula:

$$E^* = \frac{E}{1 - \nu^2}$$

Donde E^* es el m3dulo el3stico UMI y E el m3dulo el3stico de indentaci3n.

Se debe tener en cuenta que al emplear ensayos de ultra-micro indentaci3n para calcular el m3dulo el3stico, el resultado no es muy preciso dado que es dif3cil medir los par3metros adecuadamente en desplazamientos tan peque1os.

1.3.4. Ensayo de impacto Charpy

1.3.4.1. Preparaci3n de las muestras

Para la realizaci3n de estos ensayos, el procedimiento de preparaci3n de las muestras es similar al empleado para preparar los f3mures de los ensayos de flexi3n. Tras la realizaci3n de la cirug3a, se extrae la tibia (de forma m3s sencilla que el f3mur, puesto que no contiene un tornillo y no hay que dividir la atenci3n en no da1ar hueso y tornillo). Una vez la tibia ha sido extra3da, se le retiran los excesos de m3sculo, tendones etc. al igual que se hizo con los f3mures hasta dejar el hueso limpio.

A diferencia de lo hecho en con los f3mures, en las tibias no se retiran las cabezas. Esto se debe a que la longitud de la tibia disminuir3a hasta el punto de no tener luz suficiente para realizar el ensayo de impacto. Adem3s, con las cabezas de los f3mures se pueden llevar a cabo suficientes ensayos y no es necesario el uso de las ep3fisis de las tibias.

La temperatura de las tibias fue elevada a los 37^o C propios de un cuerpo vivo siguiendo el mismo procedimiento que con los f3mures: ba1o en soluci3n salina, en ba1era digital.

1.3.4.2. Procedimiento de ensayo

El procedimiento del ensayo est3 basado en la norma UNE-EN ISO 179:2, redactada para normalizar los ensayos de impacto tipo Charpy instrumentados de pl3sticos. Si bien el material que va a ser ensayado en nuestro caso no es un pl3stico, esta norma era la que mejor se adaptaba a la casu3stica a la que nos enfrentamos; aunque hubo que introducir modificaciones motivadas por la geometr3a y respuesta al impacto de las tibias.



Figura 20 - M3quina para la realizaci3n de ensayos de impacto

La m3quina empleada para la realizaci3n de los ensayos de impacto es de la marca CEAST-INSTRON. Est3 dise1ada para la realizaci3n de ensayos en base a la norma ISO 179 y las DIN 53453 y 53753. Como ya se ha mencionado, el m3todo de ensayo empleado para las pruebas de impacto en las tibias de las ratas es una adaptaci3n de la norma ISO 179. Esta m3quina es fabricada pensando en la aplicaci3n de esa norma y sus par3metros de partida son:

- Velocidad de impacto: 2'9 m/s
- Altura de impacto: 1000 mm

- 3ngulo de impacto: 150 grados
- Masa de impacto: 1'19 kg
- Distancia entre mordazas: 62 mm

Los cambios introducidos son la distancia entre apoyos y el 3ngulo inicial que forma el p3ndulo (y como consecuencia de 3ste 3ltimo cambio, la velocidad de impacto). En la norma UNE-EN ISO 179:2 se remite a la norma 179:1 para la determinaci3n de la distancia entre apoyos, que se fija en 62 mm para las probetas de los pol3meros que habitualmente se ensayan en esta m3quina. Esta condici3n no se puede cumplir por una cuesti3n anat3mica. Las tibias de las ratas suelen medir en torno a 25 mm, con lo que la distancia entre los apoyos debe ser menor para que la muestra se sostenga en el punto por el que pasa el p3ndulo al caer. Por ello, se ha adoptado una luz de apoyo de 18 mm (la distancia m3nima de luz que permite la m3quina).

El 3ngulo inicial del p3ndulo se obtiene a partir de la velocidad que debe llevar el p3ndulo en el momento del impacto. Estas velocidades est3n incluidas en una tabla en la norma 179:1 y la expresi3n a partir de la cual se obtiene el 3ngulo se recoge en la norma ISO 13802. Si bien esta velocidad est3 normalizada en los ensayos de pol3meros (obteni3ndose un 3ngulo inicial de 150 grados), no existe tal normalizaci3n en el ensayo de muestras 3seas, con lo que se ha adoptado un 3ngulo inicial de 45 grados, por ser el que ofrec3a mejores resultados. Con 3ngulos superiores al empleado, los resultados no eran suficientemente precisos al no oponer la muestra suficiente resistencia como para que la tarjeta de adquisici3n de datos pudiera hacer el an3lisis debidamente.

Una vez se han recogido los datos, estos deben ser analizados mediante diferentes herramientas estad3sticas.

1.4. Resultados

1.4.1. Ensayos de flexi3n en cuatro puntos

Para cada muestra se llev3 a cabo un ensayo de flexi3n en cuatro puntos. Las variables de salida del ensayo son la flecha en funci3n de la carga aplicada.

1.4.1.1. Fuerza m3xima

La fuerza m3xima que soport3 cada muestra durante el ensayo se calcul3 a partir de las gr3ficas obtenidas de enfrentar las dos variables mencionadas anteriormente. La figura que sigue muestra gr3ficamente los valores que se obtuvieron; sobre cada columna aparece el valor medio de la fuerza acompaado de la desviaci3n t3pica y una l3nea que sobresale la columna mostrando la proporcionalidad entre desviaci3n y media. Se han incluido las fuerzas obtenidas tanto para los f3mures derechos como para los izquierdos con la intenci3n de poder compararlos f3cilmente.

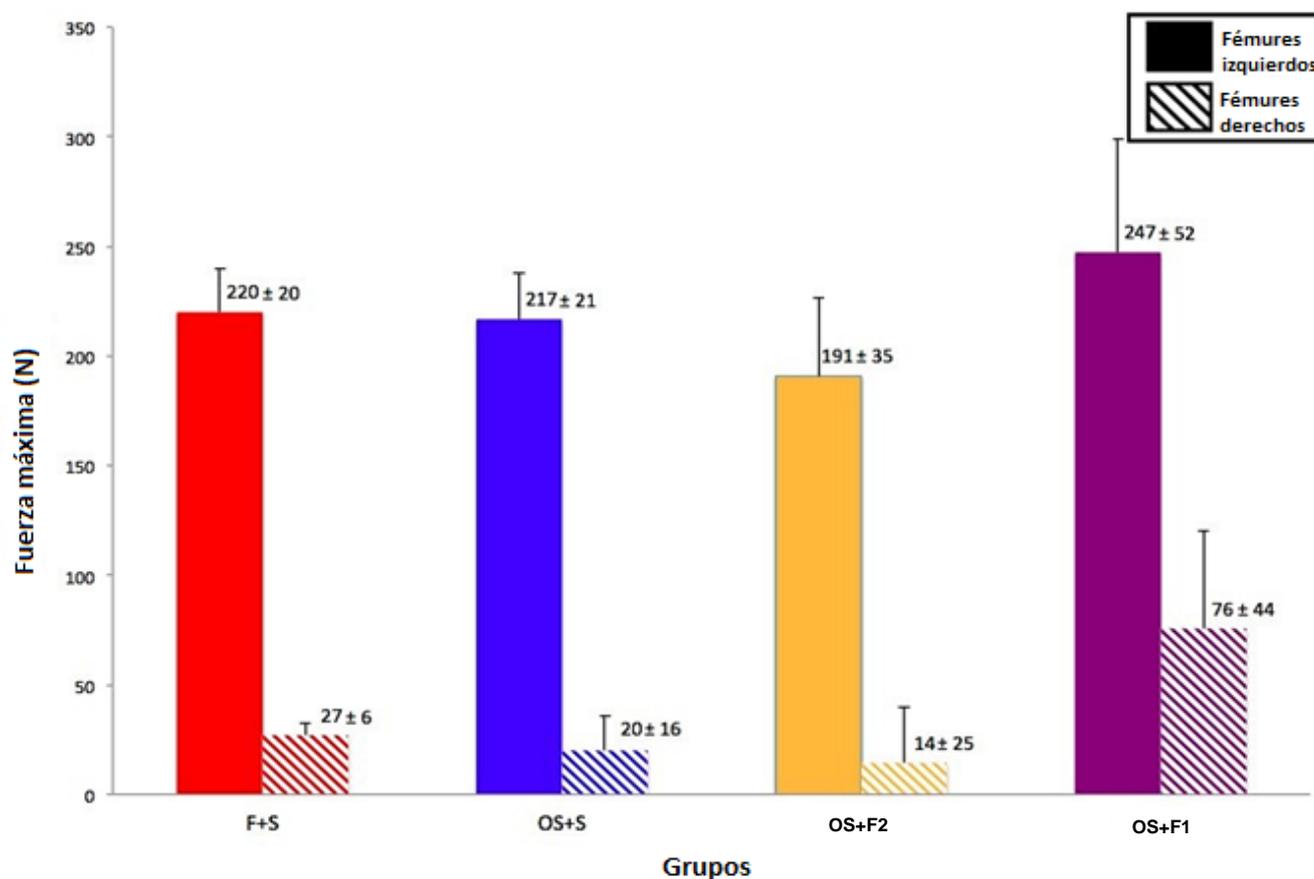


Figura 21 - Valores m3ximos medios y desviaciones t3picas obtenidas

Los f3mures izquierdos (barras s3lidas) ofrecieron resultados muy consistentes a lo largo del estudio, hecho por el que se obtuvieron desviaciones t3picas muy bajas (teniendo en cuenta el origen biol3gico de las muestras). La desviaci3n t3pica es especialmente baja en los grupos de fractura simple (F+S) y control (OS+S). Los dos grupos tratados presentan desviaciones t3picas algo superiores a las anteriores, que podr3an deberse a la influencia de la reacci3n del animal al tratamiento. Al igual que en los humanos, la reacci3n de los individuos var3a entre unos y otros, frecuentemente debido a las diferencias gen3ticas.

Los valores de la fuerza m3xima para los f3mures izquierdos no var3an mucho entre los distintos grupos considerados (la mayor variaci3n se obtiene entre los dos grupos tratados). El grupo de control (OS+S) y el grupo con fractura normal (F+S) presentan valores muy similares: 217 N y 220 N

respectivamente, hecho que era de esperar puesto que se trata de huesos no operados que no han seguido tratamientos m3dicos.

El mayor valor de fuerza m3xima se obtiene para el f3rmaco n3mero 1 (OS+F1) con 247 N, que es un valor considerablemente mayor que el obtenido para la fractura normal y el grupo de control. El tratamiento con el f3rmaco n3mero 2, sorprendentemente, parece debilitar los huesos en lugar de fortalecerlos; a la vista de los resultados de fuerza m3xima obtenidos, que son los m3s bajos de los cuatro grupos. En cualquier caso, estos resultados deben ser comparados con los obtenidos en los f3mures derechos para poder llegar a una conclusi3n sobre qu3 tratamiento es el m3s efectivo.

Los f3mures derechos (barras rayadas), presentan diferencias notables en los valores de fuerza m3xima y sus desviaciones t3picas son altas salvo para el grupo con fractura normal (F+S) cuyo valor es de solo 6 N. Los altos valores de las desviaciones t3picas se explican debido a la gran variaci3n existente entre los resultados de los ensayos durante las dos primeras fases del estudio. Debido al hecho de que las gr3ficas correspondientes al grupo OS+F2 no ofrecieron valores fiables, no fue posible hallar valores fuerza m3xima para esas muestras. La raz3n principal que explica la alta variabilidad de los resultados y la dificultad de obtener resultados viables es la condici3n f3sica de los huesos operados. Los f3mures derechos tienen un callo 3seo en el centro de la di3fisis (fuste), lo que hace que el ensayo de flexi3n sea menos preciso y m3s dif3cil de llevar a cabo (especialmente en los casos en que el callo tiene un gran tama3o). Esta es la raz3n de que el grupo OS+F1 tenga una desviaci3n t3pica de 44 N para un valor medio de fuerza m3xima de 76 N. De la misma forma, el grupo OS+F2 tiene un valor medio de 14 N con una desviaci3n t3pica de 25 N. EN cualquier caso, esta alta variabilidad no afecta al an3lisis entre grupos, puesto que las diferencias son grandes.

El grupo F+S tiene un valor medio de fuerza m3xima de 27 N, seguido por el grupo de control (OS+S) cuyo valor medio es de 20 N. El resultado obtenido es el que se esperaba, puesto que los f3mures a los que

se ha realizado la osteotomía de sustracci3n tienen una dificultad a3adida para regenerar la zona, y el callo 3seo que se forma debilita el hueso. Al igual que ocurría con los f3mures izquierdos, el f3rmaco n3mero 2 parece debilitar el callo 3seo con respecto al grupo de control (los valores medios de la fuerza m3xima son 14 N y 20 N, respectivamente).

El mayor valor medio de la fuerza m3xima se obtiene para el tratamiento con el f3rmaco n3mero 1 (76 N), triplicando el valor obtenido para el grupo F+S y cuadruplicando el valor del grupo de control. As3, si bien la desviaci3n t3pica es alta, el grupo OS+F1 ofrece un valor medio considerablemente superior al del resto de grupos.

Si tenemos en cuenta los valores obtenidos tanto para los f3mures derechos como para los izquierdos, se observa un patr3n de comportamiento similar. El grupo con fractura normal y el grupo de control se comportan de forma equiparable, ofreciendo valores superiores a los del grupo tratado con el f3rmaco n3mero 2 (OS+F2) pero inferiores a los del grupo tratado con el f3rmaco n3mero 1 (OS+F1), que ofrece valores significativamente superiores. Esta diferencia es m3s acusada en los huesos que han sido operados, en los que se forma el callo 3seo. As3, el tratamiento con el f3rmaco n3mero 2 hace decrecer el valor de fuerza m3xima por debajo de los valores obtenidos para los grupos F+S y OS+S. Sin embargo, el tratamiento con el f3rmaco n3mero 1 hace que los valores de fuerza m3xima aumenten por encima incluso de los obtenidos para el grupo F+S (incluso habi3ndose formado callo 3seo). De esto se deduce que el tratamiento con el f3rmaco n3mero 1 otorga a los huesos del animal una mayor capacidad de soportar esfuerzos.

Teniendo en cuenta la distancia existente entre las partes superior e inferior de los f3mures (medida mediante rayos X) y los valores de la fuerza m3xima, la relaci3n entre ambos puede ser mostrada en forma de gr3fica con la intenci3n de comparar la influencia de la separaci3n en la evoluci3n del tratamiento. En la gr3fica que sigue se ha hecho lo anteriormente indicado y se han dibujado sobre la gr3fica las l3neas de tendencia.

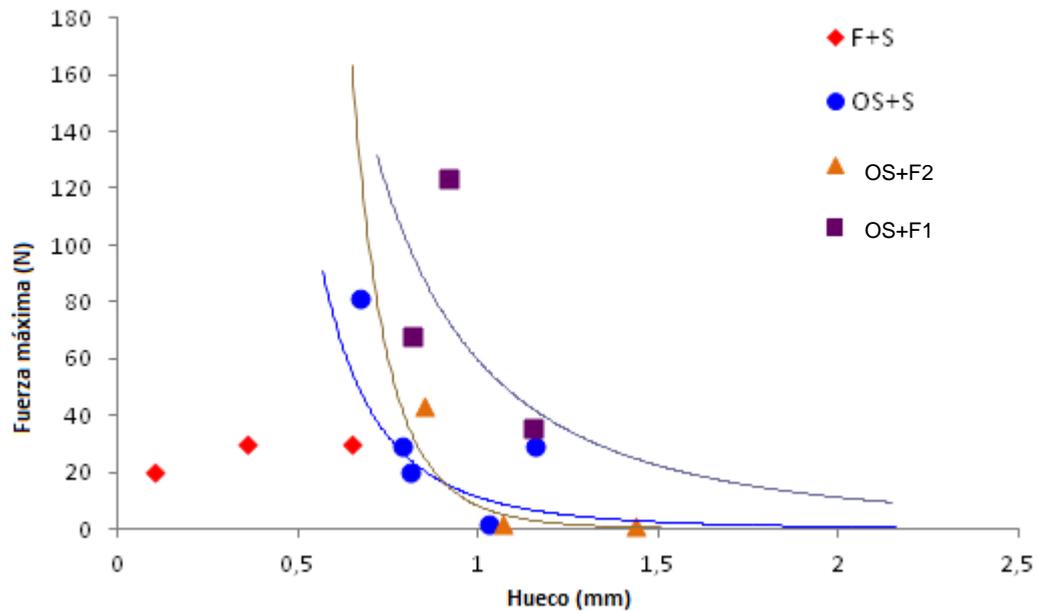


Figura 22 - Relaci3n entre la fuerza m3xima y el hueco entre fragmento del f3mur

Si bien es dif3cil interpretar correctamente los resultados de la gr3fica anterior, la eficacia de los tratamientos es f3cilmente comprensible. Por encima de un cierto valor de la distancia entre partes del f3mur, el f3rmaco n3mero 1 es m3s efectivo que el n3mero 2; visto que para una distancia similar, el f3rmaco 1 es capaz de soportar una fuerza mayor que el f3rmaco 2.

La l3nea de tendencia del grupo OS+S queda visiblemente por debajo de la que sigue el f3rmaco 2 hasta una distancia entre partes de 0,9 mm aproximadamente. Por encima de ese valor, la l3nea de tendencia del f3rmaco 2 queda por debajo de la del grupo de control. As3, el grupo tratado con el f3rmaco 2 muestra el efecto negativo del mismo a la hora de soportar fuerza (especialmente si tenemos en cuenta que, originalmente, en este estudio se pretend3a distancias entre partes de 2 mm). La relaci3n entre la fuerza m3xima y la separaci3n entre las partes del f3mur reafirma la conclusi3n de que el f3rmaco 1 es el tratamiento m3s efectivo en casos de osteotom3a de sustracci3n con separaciones superiores a los 0,75 mm.

1.4.1.2. Energ3a almacenada hasta fuerza m3xima

El ensayo de flexi3n en cuatro puntos tambi3n permite el c3lculo de la energ3a absorbida hasta alcanzar la fuerza m3xima (E_a), cuyo an3lisis estad3stico se muestra en la gr3fica que sigue. La forma de representar los resultados es equivalente a la empleada en el apartado anterior.

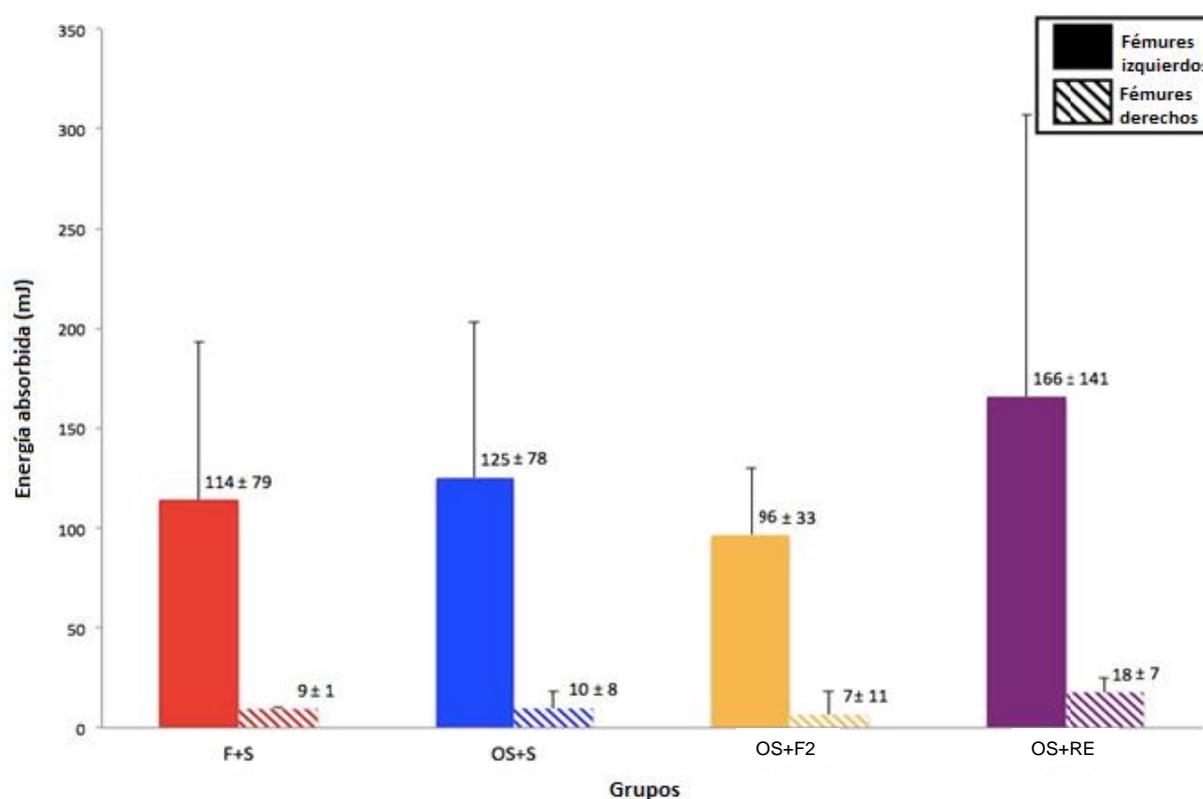


Figura 23 - Energ3a m3xima media y desviaciones t3picas para los distintos grupos

La energ3a absorbida (E_a) se calcula en mJ y se puede emplear para estimar la resiliencia del hueso, pero este procedimiento no se pudo llevar a cabo en los huesos que hab3an sido operados (f3mures derechos). Para estimar la resiliencia se debe medir el 3rea de la secci3n de rotura, pero la presencia del callo 3seo hace que la medici3n sea imprecisa ya que es dif3cil diferenciar el tejido 3seo del callo. Con esto presente, para poder comparar

los resultados de f3mures derechos e izquierdos se opt3 por el c3lculo de la energ3a absorbida hasta alcanzar la fuerza m3xima.

En la gr3fica anterior se observa que la desviaci3n t3pica es alta para los f3mures izquierdos de todos los grupos. El mayor valor lo alcanza el grupo OS+F1, que tiene un valor de desviaci3n t3pica de 141 mJ para un valor medio de energ3a absorbida de 161 mJ. Tal y como se ha dicho anteriormente, esta gran variaci3n puede deberse a la reacci3n de cada animal al tratamiento.

La media de la E_a que se obtiene para el grupo F+S (114 mJ) est3 un por debajo de la obtenida para el grupo OS+S (125 mJ); los resultados obtenidos para los f3mures izquierdos de estos dos grupos deber3an ser similares puesto que no han sido operados ni han seguido tratamientos m3dicos.

El valor m3s bajo de energ3a absorbida (96 mJ) se obtuvo para el tratamiento con el f3rmaco 2, que parece reducir la capacidad del hueso de absorber energ3a. Este valor de energ3a absorbida presenta la desviaci3n t3pica m3s baja del conjunto, reforzando su validez. Por otro lado, el f3rmaco n3mero 1 produce una recuperaci3n del hueso que le permite absorber mayor energ3a que los pertenecientes al grupo F+S. El valor medio de E_a para el grupo OS+F1 es de 166 mJ, mientras que su desviaci3n t3pica es de 141 mJ (valor alto). A pesar de este alto valor de desviaci3n t3pica, las muestras de este grupo fueron las que mejor respondieron en t3rminos de absorci3n de energ3a. En cualquier caso, para poder ser concluyentes sobre la efectividad del tratamiento es necesario analizar los resultados obtenidos para los f3mures derechos.

La variaci3n existente en los resultados obtenidos para los f3mures derechos se debe a la dificultad existente a la hora de llevar a cabo el ensayo de flexi3n en cuatro puntos, derivada de la existencia del callo 3seo. Los grupos OS+S y OS+F2 presentan desviaciones t3picas altas, que se pueden explicar por la dificultad existente a la hora de determinar cuando se produce la fractura de la muestra; ya que la presencia de tejido fibrocartilaginoso hace que el hueso no se parta en dos mitades, lo que

conlleva dificultad a la hora de medir la fuerza m3xima con precisi3n y como consecuencia tambi3n la energ3a absorbida.

Por otro lado, los grupos F+S y OS+F1 tienen desviaciones t3picas bajas, que llevan a pensar que en el caso del f3rmaco 1 el tratamiento conlleva la formaci3n de un callo resistente; y en el caso de la fractura simple, que la curaci3n se est3 desarrollando con normalidad.

La E_a absorbida por el grupo F+S es de 9 mJ, muy similar a la del grupo de control, cuyo valor es de 10 mJ. Si bien el grupo de control debiera ser menos apto a la hora de soportar cargas, la presencia del callo le da al hueso una mayor capacidad de absorber energ3a. Los huesos pertenecientes al grupo F+S deber3an estar muy pr3ximos a la plena recuperaci3n cuando se les realiz3 el ensayo; de ah3 que un hueso sometido a fractura normal sea m3s fr3gil debido a que la ausencia de tejido fibrocartilaginoso (el presente en el callo 3seo) no permite absorber tanta energ3a.

El tratamiento con el f3rmaco n3mero 2 no condujo a la formaci3n de un callo resistente, visto que el valor de E_a para este grupo es de solo 7 mJ. Las muestras del grupo OS+F2 tienen una capacidad reducida de absorci3n de energ3a y son m3s d3biles que las del grupo de control y el de fractura normal. El tratamiento con el f3rmaco 1, sin embargo, da lugar a muestras m3s resistentes, con un valor medio de E_a de 18 mJ. El callo parece establecer un equilibrio entre resistencia y ductilidad. As3, las muestras tratadas con el f3rmaco n3mero 1 son las que tienen una mayor capacidad de soportar grandes esfuerzos antes de fallar (en t3rminos de energ3a absorbida).

En conjunto, el tratamiento con el f3rmaco 1 ofrece mejores resultados que el tratamiento con el f3rmaco 2, en t3rminos de absorci3n de energ3a. Esto convierte a las muestras del grupo OS+F1 virtualmente m3s resistentes a las fracturas. En cualquier caso, la medici3n de la energ3a absorbida por un material hasta la fractura no permite dar una idea de la flexibilidad del mismo.

1.4.1.3. Rigidez

Para un mismo valor de energa absorbida, dos materiales pueden presentar valores muy distintos de rigidez. Es importante conocer la energa que un material absorbe para calcular su tenacidad, pero este valor no caracteriza por completo al material. Las curvas fuerza-desplazamiento empleadas para el c3lculo de la rigidez se encuentran en el ap3ndice A.

Los valores de rigidez de la muestras se representan en el diagrama de dispersi3n que sigue. Se han incluido los valores de los f3mures derechos e izquierdos para facilitar la comparaci3n de resultados. La rigidez media de cada grupo se indica (en $N \cdot mm^{-1}$) de forma num3rica junto a la nube de puntos correspondiente.

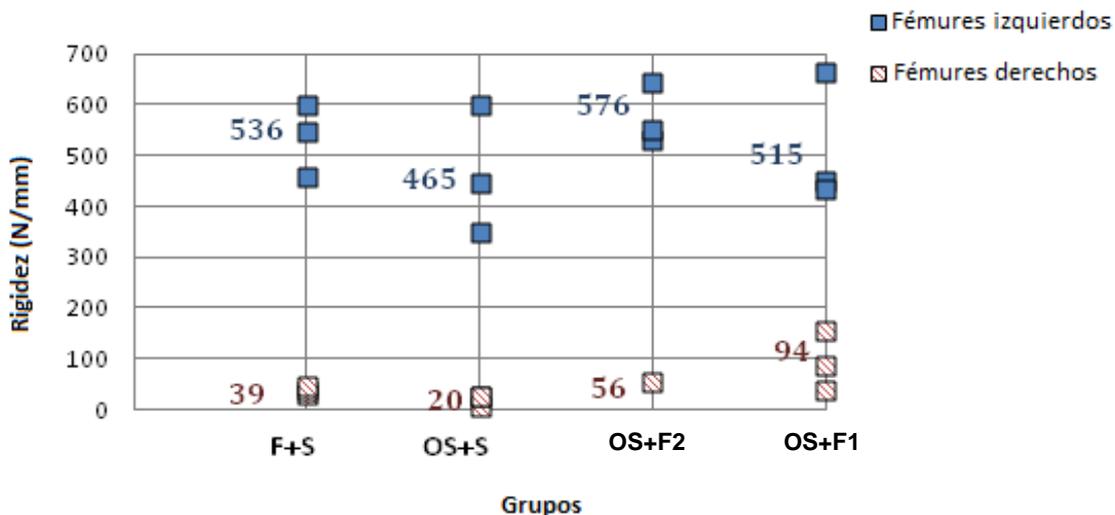


Figura 24 - Diagrama con la rigidez de las distintas muestras

Los valores de rigidez obtenidos varían considerablemente, aunque se muestra una tendencia com3n. Esta tendencia es m3s evidente en los f3mures derechos, donde hay un efecto m3s acusado derivado de la osteotomía de sustracci3n. El valor medio de rigidez obtenido para el grupo F+S es sustancialmente mayor que el obtenido para el grupo de control tanto para los f3mures operados como los que quedaron sin operar. Estos

resultados se corresponden perfectamente con lo esperado ya que un hueso que ha sufrido una fractura normal deber3a ser m3s r3gido que uno sometido a una osteotom3a de sustracci3n.

Ambos tratamientos incrementan la rigidez de los f3mures derechos, el grupo OS+F1 devuelve un valor de rigidez de $94 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-1}$, mientras que el grupo OS+F2 da un valor de $56 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-1}$. Hay que recordar lo dicho en el apartado correspondiente al estudio de la fuerza m3xima, y es que para las dos primeras fases del estudio, no se pudieron llevar a cabo ensayos de flexi3n en los f3mures derechos de las ratas del grupo OS+F2, de ah3 que s3lo haya un punto. Esta es la raz3n de que no haya un valor medio como tal, sino s3lo una muestra; con lo que el valor no es representativo de la efectividad del tratamiento en f3mures derechos.

Desde el punto de vista de la rigidez, no est3 claro cu3l es el efecto que tienen los tratamientos en los f3mures izquierdos. Sin embargo, para los f3mures operados, ambos tratamientos parecen tener un efecto positivo al incrementar la rigidez. Este incremento es m3s perceptible en los f3mures tratados con el f3rmaco 1. En cualquier caso, los tratamientos no pueden ser comparados con la suficiente precisi3n con los datos obtenidos.

Los ensayos de flexi3n en cuatro puntos permitieron determinar la fuerza m3xima, energ3a absorbida hasta fuerza m3xima y rigidez. Para aumentar el rango del estudio, tambi3n se llevaron a cabo los ensayos de ultra-micro indentaci3n.

1.4.2. Ensayos de ultra-micro indentaci3n

1.4.2.1. Dureza cortical y trabecular

Los ensayos de ultra-micro indentaci3n se llevaron a cabo con la intenci3n de estudiar las durezas de las zonas cortical y trabecular. Para entender mejor c3mo se distribuye el material analizado, la figura siguiente

esquematiza las diferentes zonas consideradas. Cada zona 3sea ensayada corresponde con uno de los diagramas de cajas que se muestran m3s adelante. En cada diagrama, hay cuatro cajas que corresponden con los cuatro grupos analizados, lo que permite comparar f3cilmente las durezas de zonas equivalentes en funci3n de la intervenci3n y el tratamiento. Los dos tipos de tejido (cortical y trabecular) se deben analizar por separado y representar por separado, y los resultados obtenidos no se pueden combinar para obtener un valor medio. Estos dos tipos de tejido se forman diferente, lo que hace necesaria una distinci3n en el an3lisis (el hueso cortical es m3s duro y compacto que el hueso trabecular).

Desde el punto de vista anatómico, la extremidad superior est3 unida a la cadera y la inferior a la tibia. La extremidad inferior es la zona del hueso por la que se introducía el tornillo que simulaba la pseudoartrosis, con lo que fue imposible realizar ensayos en esa zona (s3lo f3mures derechos).

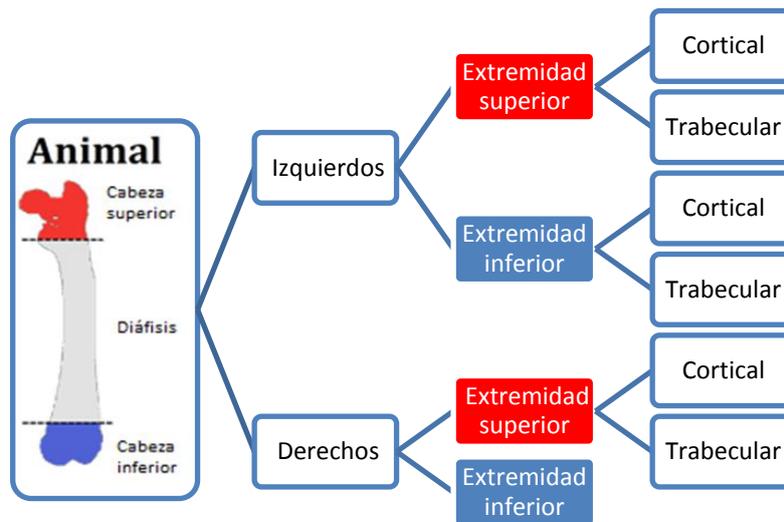


Figura 25 - Esquema de las 3reas estudiadas en los ensayos UMI

Los diagramas que se van a ir mostrando a continuaci3n representan los resultados obtenidos para los ensayos de dureza de las zonas recogidas en el esquema anterior. En estos diagramas, la caja representa el rango intercuartílico (el l3mite inferior lo dan el 25% de los datos y el superior el 75% de los mismos) y la l3nea la mediana. El cuadrado representa la media y las l3neas extremas o "bigotes" dan un valor superior igual al del tercer cuartil m3s 1'5 por el rango intercuartílico; y un valor inferior igual al del

primer cuartil menos 1'5 veces el rango intercuartílico. Los valores se3alados con una cruz representan los valores mayor y menor obtenidos durante los ensayos (valores extremos).

Al analizar grandes conjuntos de valores (tal y como ocurre en los ensayos de dureza), se deben considerar herramientas estadísticas que permitan determinar patrones y variaciones existentes entre las distintas muestras. Para comparar las respuestas de los distintos tratamientos, se llevó a cabo una prueba t de Student con dos muestras. La hipótesis nula es que las medias de los dos grupos comparados son iguales (no se considera igual la varianza). Así, si el parámetro p toma un valor inferior a 0.05, la hipótesis nula no se considera válida y los dos grupos que se comparan se consideran significativamente diferentes. Por el contrario, si el valor del parámetro p es mayor que 0.05, los grupos comparados no se consideran significativamente distintos. Se tomó el grupo de control como referencia para comparar con el resto. El valor del parámetro p para cada grupo se puede observar en las gráficas, así como la media, la desviación típica y el número de muestras, que están situados sobre cada caja.

En la gráfica que sigue, se pueden ver los resultados obtenidos de los ensayos realizados sobre la zona cortical de las cabezas inferiores de los fémures izquierdos. Esta zona no presenta grandes cambios entre los distintos grupos. Los únicos grupos entre los que se aprecia una variación significativa son el grupo OS+S y F+S, cuyo valor p es muy bajo. Esto implica que la osteotomía de sustracción contribuye a una debilitación de los huesos, como consecuencia de una reducción de los recursos del mismo. Todos los grupos presentan distribuciones homogéneas y variaciones bajas. La media obtenida para el grupo OS+F1 (520 MPa) es mayor que la obtenida para el grupo OS+F2 (490 MPa), con lo que deducimos que el tratamiento con el fármaco 1 es ligeramente más efectivo que el tratamiento con el fármaco 2. Ambos tratamientos presentan resultados homogéneos cuyas medias son mayores que la del grupo de control (470 MPa). El parámetro p que relaciona al grupo de control y al grupo OS+F2 tiene un valor muy próximo a 0.05, lo que significa que no se puede determinar si existe una diferencia significativa entre esos dos grupos de muestras.

Con esto, el f3rmaco 1 demuestra ser m3s efectivo al tener un valor de dureza superior al del grupo de control. Sin embargo, todas las muestras que han recibido tratamientos tienen un valor m3nimo de dureza superior al de las muestras no tratadas, de lo que se deduce que los tratamientos incrementan la dureza m3nima de los huesos. En definitiva, en el tejido cortical de la cabeza inferior de los f3mures izquierdos, ambos tratamientos demuestran su efectividad al suministrar resultados homog3neos y valores de dureza consistentes.

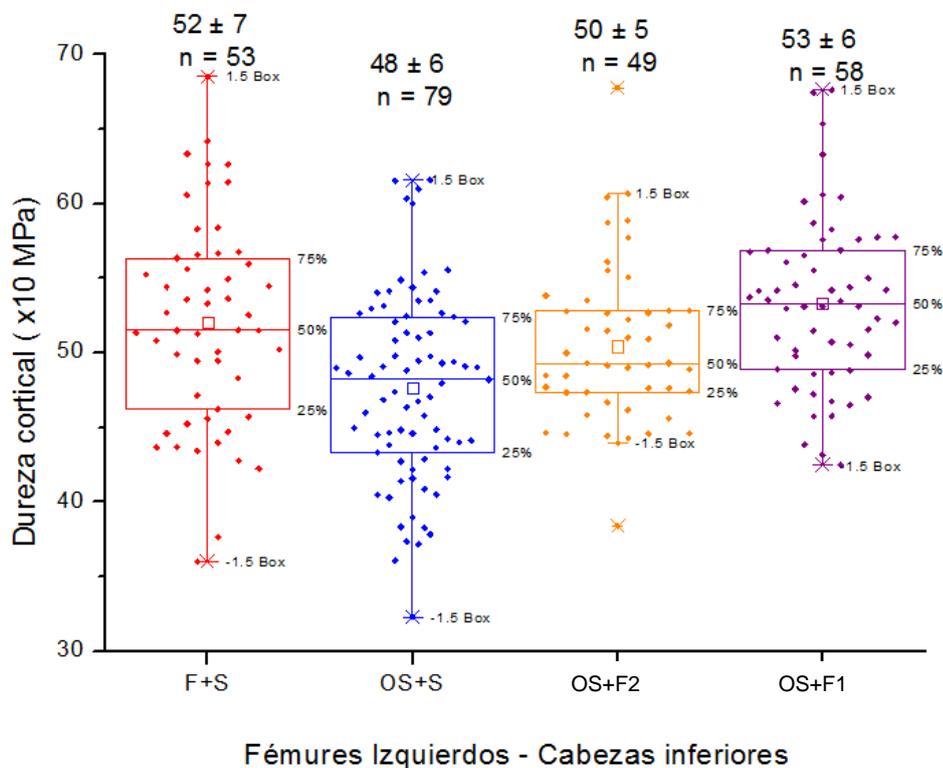


Figura 26 - Diagramas de caja de las durezas corticales de las cabezas inferiores de los f3mures izquierdos.
 $p < 0.01$ para OS+S contrs F+S y OS+S contra OS+F1. $p = 0.05$ para OS+S contra OS+F2

Los resultados obtenidos para los ensayos sobre la zona trabecular de las cabezas inferiores de los f3mures izquierdos se presentan la gr3fica siguiente. Los valores obtenidos son similares a los hallados para los ensayos en la zona cortical. Los resultados obtenidos en el tejido trabecular tienen una distribuci3n menos homog3nea consecuencia de la naturaleza

compleja del tejido. El alto valor que toma el par3metro p que relaciona a los grupos OS+S y F+S confirma su semejanza. En lo referente a la efectividad de tratamientos, el f3rmaco 2 tiene la media m3s baja (480 MPa), mientras que el f3rmaco 1 tiene la m3s alta (550 MPa). Los grupos OS+F1 y OS+F2 son significativamente diferentes del grupo de control, las muestras del grupo OS+F1 tienen valores mucho mayores y las muestras del grupo OS+F2 mucho menores que el grupo de control. El tratamiento con el f3rmaco 2 parece dar resultados con menores variaciones. Comparando estos resultados con los obtenidos para el tejido cortical, en ambos casos se obtiene un incremento de la dureza m3nima. Se puede decir que para la zona trabecular de las cabezas inferiores de los f3mures izquierdos, el tratamiento con el f3rmaco 2 es menos efectivo.

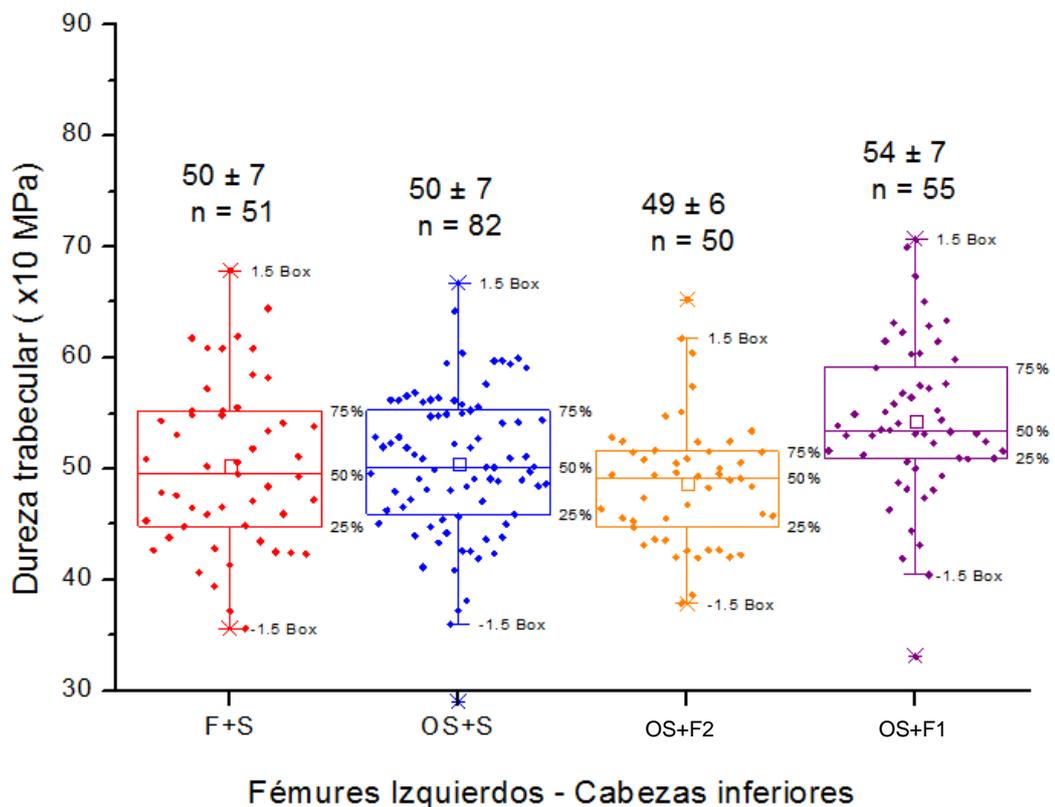


Figura 27 - Diagramas de caja de las durezas trabeculares de las cabezas inferiores de los f3mures izquierdos. $p < 0.05$ para OS+S contra OS+F2 y OS+S contra OS+F1. $p > 0.1$ para OS+S contra F+S.

Cuando se estudian valores de dureza, es importante analizar zonas distintas del mismo tejido, pues los efectos del tratamiento pueden variar de unas zonas a otras. A continuaci3n se puede ver la gr3fica con los resultados obtenidos para la zona cortical de la cabeza superior de los f3mures izquierdos. Los resultados aqu3 difieren de los obtenidos en las zonas anteriores. Las medias de los grupos F+S y OS+S son parecidas y la del grupo de control ligeramente superior. EL f3rmaco 1 da como resultado la media m3s baja (550 MPa), mientras que el f3rmaco 2 da la m3s alta (640 MPa).

Con esto, el f3rmaco 2 parece incrementar la dureza de esta zona de los huesos, mientras que el f3rmaco 1 la hace decrecer. Ambos f3rmacos dan lugar a desviaciones t3picas bajas, lo que da prueba de la consistencia de los resultados obtenidos. El grupo de control tiene una dispersi3n de resultados bastante alta, achacada a la diferente forma que tienen los animales de reaccionar a la osteotom3a de sustracci3n. En lo que concierne al par3metro p , los 3nicos grupos que pueden considerarse similares son el grupo de control y el grupo con fractura normal. Tanto las muestras del grupo OS+F2 (con valores mayores) como las del grupo OS+F1 (con valores menores), son significativamente diferentes de las del grupo de control.

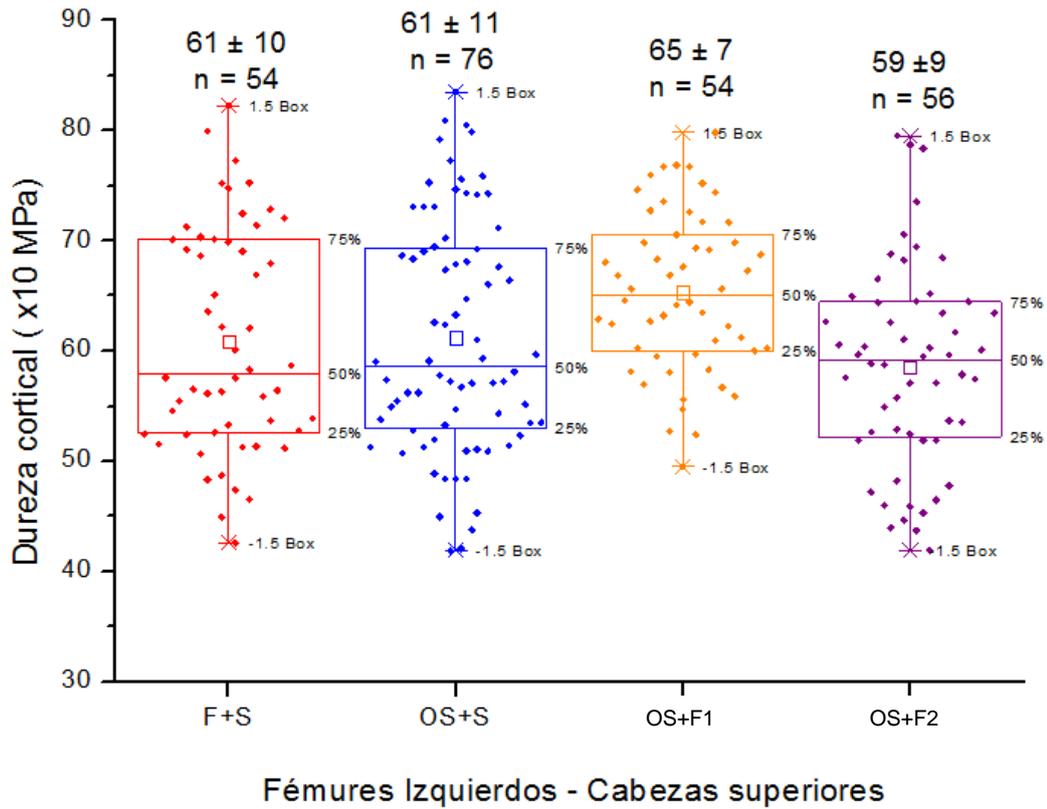


Figura 28 - Diagramas de caja de las durezas corticales de las cabezas superiores de los f3mures izquierdos.
 $p < 0.01$ para OS+S contra OS+F2 y OS+S contra OS+F1. $p > 0.1$ para OS+S contra F+S.

As3, en t3rminos de la dureza cortical de las cabezas superiores de las tibias izquierdas, el f3rmaco 2 demuestra ser m3s efectivo que el f3rmaco 1. A3n as3, hay que tener en cuenta que este es el 3nico caso en el que el f3rmaco 2 da lugar a muestras con valores superiores a las del f3rmaco 1, por lo que no debe descartarse alg3n tipo de imprecisi3n en los datos. Se cree que esta imprecisi3n se debe a la heterogeneidad de los datos estudiados. En un caso ideal, se podr3an haber realizado m3s ensayos para esta zona en concreto, con el objetivo de incrementar la precisi3n. Otra opci3n es que el f3rmaco 2 se comporte mejor en esta zona debido a su situaci3n anatómica. Cabe la posibilidad de que este f3rmaco se propague mejor en la cabeza superior de los f3mures izquierdos. Esta hip3tesis deber3a ser confirmada en un estudio m3s extensivo sobre la propagaci3n y distribuci3n de los f3rmacos en el animal. A3n as3, hay que hacer hincapi3

en que este caso es muy particular, pues el resto de ensayos de dureza no muestran el mismo patr3n de comportamiento.

Los valores obtenidos para la dureza trabecular de las cabezas superiores de los f3mures izquierdos se recogen en la gr3fica que sigue. La tendencia que se observa es la misma que en la gr3fica anterior, con una media para el f3rmaco 1 que toma un valor de 560 MPa, mientras que el f3rmaco 2 tiene una media de 570 MPa. Todos los grupos presentan desviaciones t3picas bajas, apoyando la consistencia de estos ensayos. El grupo de control tiene la media m3s baja (540 MPa), debido a la ausencia de un tratamiento; lo que deja al organismo a merced de sus propios recursos a la hora de formar el callo. El grupo con fractura normal presenta una dispersi3n baja y un valor m3nimo de dureza bastante alto.

Seg3n los valores de p calculados, los grupos F+S, OS+S y OS+F1 son similares, mientras que los grupos OS+S y OS+F2 son significativamente distintos. Se esperaba que los grupos OS+S y F+S fueran similares, pero los grupos OS+F1 y OS+S deber3an ser distintos. En este caso, el grupo OS+F1 tiene una media que est3 ligeramente por encima (560 MPa) de la del grupo de control. Aunque el tratamiento con el f3rmaco 1 es efectivo y da lugar a una distribuci3n muy homog3nea, no se puede afirmar que sea el m3s efectivo. El f3rmaco 2 tiene un valor extremo inferior bajo y un valor extremo superior alto, adem3s de la media de mayor valor del conjunto (570 MPa). Para esta zona en particular, ambos tratamientos dieron lugar a una buena recuperaci3n de la dureza del hueso y a valores m3nimos superiores al que dio el grupo de control.

En cualquier caso, el tratamiento con el f3rmaco 2 es m3s efectivo puesto que da lugar a valores de dureza superiores a los obtenidos para el grupo F+S. A3n as3, el f3rmaco 1 consigue hacer que los valores de dureza se incrementen hasta valores similares a los obtenidos para la fractura normal, lo que lo hace poco menos efectivo que el f3rmaco 2.

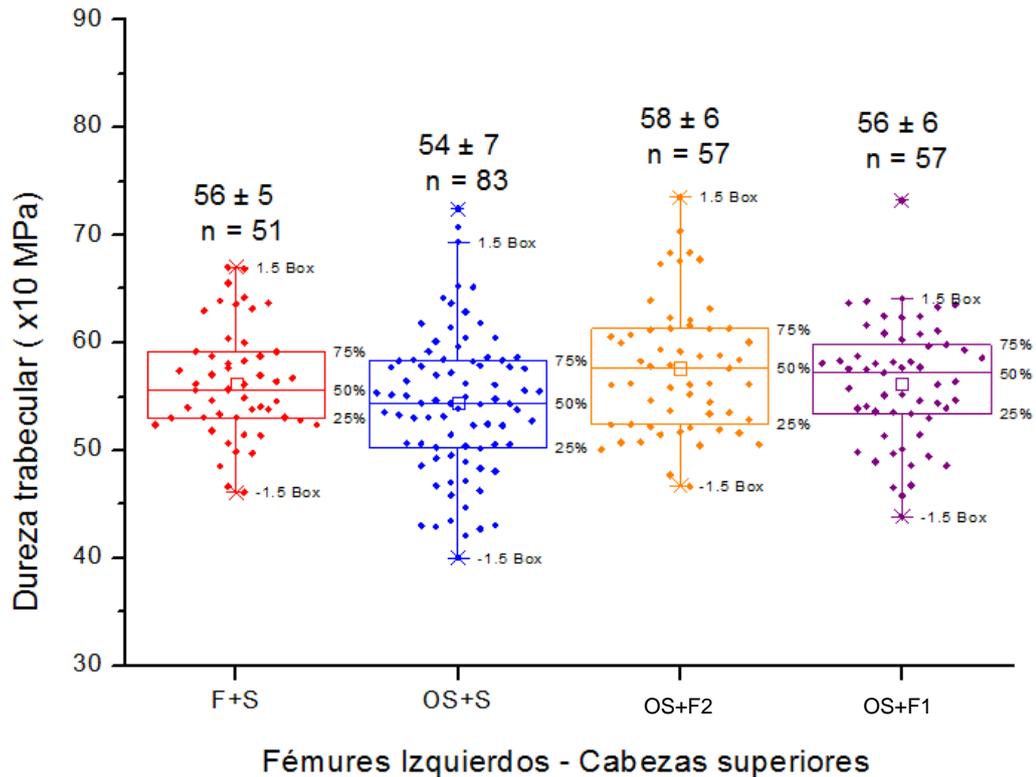


Figura 29 - Diagramas de caja de las durezas trabeculares de las cabezas superiores de los f3mures izquierdos.
 $p < 0.1$ para OS+S contra OS+F2. $p > 0.05$ para OS+S contra F+S y OS+S contra OS+F1.

Como se ha explicado anteriormente, los f3mures derechos s3lo dan muestras de la cabeza superior debido a que la cabeza inferior queda da3ada al introducir el tornillo empleado para mantener la distancia deseada entre las partes superior e inferior del hueso tras la osteotom3a de sustracci3n. Los valores de dureza obtenidos para la cabeza superior de los f3mures derechos se recogen en la gr3fica que sigue. En esta zona, los resultados tienen una variaci3n muy alta debido a la naturaleza biol3gica de las muestras y al efecto de los tratamientos en los animales.

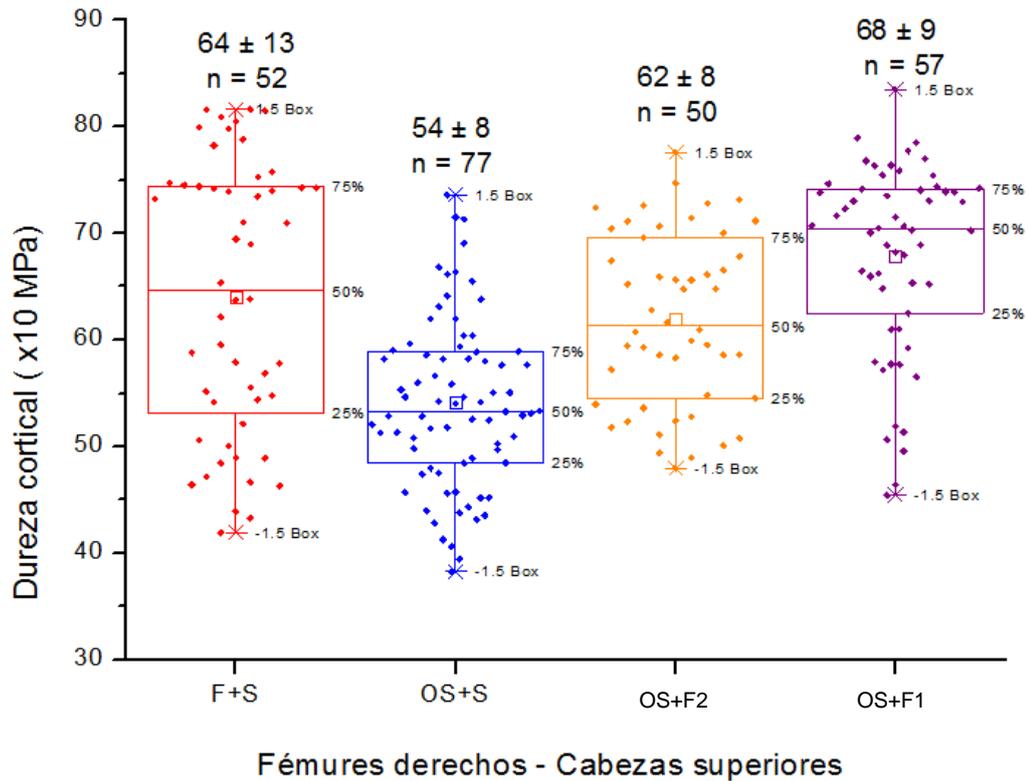


Figura 30 - Diagramas de caja de las durezas corticales de las cabezas superiores de los f3mures derechos.
 $p < 0.01$ para OS+S contra F+S, OS+S contra OS+F2 y OS+S contra OS+F1.

Al comparar el grupo de control con el resto de grupos, el par3metro p se encontr3 bastante por debajo de 0.05, lo que significa que existen diferencias significativas entre el grupo de control y los dem3s grupos. El grupo de control tiene un rango amplio, la menor media (530 MPa) y el menor valor m3nimo. Los dos tratamientos mostraron medias superiores a la del grupo de control y el grupo de fractura normal al mismo tiempo que dieron valores m3nimos mucho mayores. As3, los dos tratamientos fueron efectivos a la hora de incrementar la dureza de los huesos.

El tratamiento con el f3rmaco 2 tiene una media ligeramente mayor (610 MPa) que la del grupo F+S (590 MPa), lo que lo hace entender que es capaz de hacer que el hueso se recupere. A3n con esto, el f3rmaco 1 da lugar a la media de dureza m3s alta (670 MPa), en un grupo en el que la mayor3a de los valores se encuentran en torno a los 700 MPa. As3, se puede

decir que el f3rmaco 1 es m3s efectivo que el f3rmaco 2 en la zona cortical de las cabezas superiores derechas de los f3mures.

El tejido trabecular es m3s fr3gil y el3stico que el cortical, lo que suele dar lugar a mayores diferencias en los resultados. Cuanto m3s acentuada sea esta diferencia, m3s f3cil es ver cu3l de los tratamientos es m3s efectivo. Para la dureza de la zona trabecular de la cabeza superior de los f3mures derechos (cuyos resultados se recogen en la gr3fica que sigue), el f3rmaco 1 parece resultar m3s efectivo que el f3rmaco 2. La media obtenida para el grupo OS+F1 (570 MPa) es mayor que la obtenida para el grupo OS+F2 cuyo valor es de 540 MPa. Ambos grupos tienen medias y valores m3nimos superiores a los del grupo de control. El rango de los grupos tratados es peque1o, lo que muestra la valide de los resultados que se obtienen al utilizar estos tratamientos. La media m3s baja es la del grupo de control, que tienen una distribuci3n homog3nea de los resultados pero a su vez cuenta con un rango amplio.

La variaci3n existente en el grupo de control estaba prevista, ya que todas las muestras reaccionan de forma distinta durante el proceso de curaci3n tras ser sometidas a la osteotom3a de sustracci3n. Algunas de las ratas crean callos m3s resistentes, cuya consecuencia es la dispersi3n de resultados. La media m3s alta corresponde a las muestras del grupo F+S (590 Mpa), que adem3s tienen una distribuci3n muy homog3nea. Esto se debe a que la fractura normal cura m3s f3cilmente que un caso de pseudoartrosis.

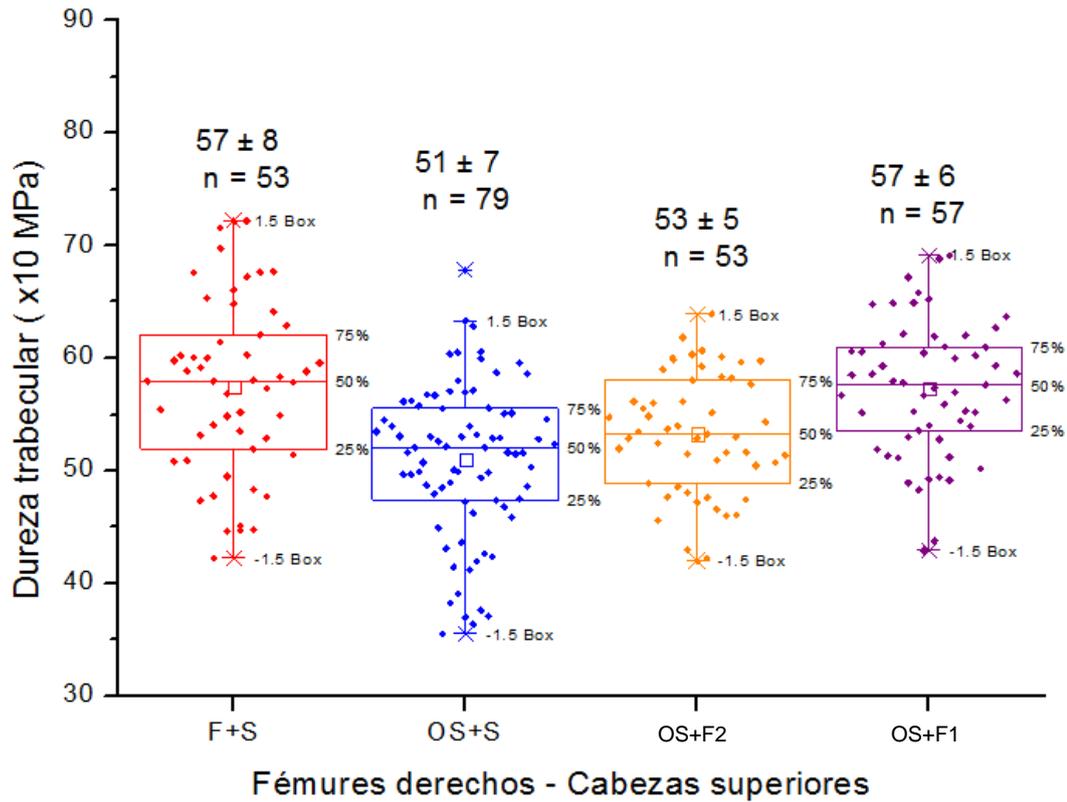


Figura 31 - Diagramas de caja de las durezas trabeculares de las cabezas superiores de los f3mures derechos. $p < 0.05$ para OS+S contra F+S, OS+S contra OS+F2 y OS+S contra OS+F1.

El an3lisis del par3metro p revela que todos los grupos son significativamente distintos del grupo de control. Tanto el grupo OS+F1 como el grupo OS+F2 tienen altos valores de dureza, lo que muestra la efectividad de los tratamientos; pero el f3rmaco 1 tiene una media superior a la del f3rmaco 2. Con esto, se puede afirmar que para la zona trabecular de las cabezas superiores de los f3mures derechos el f3rmaco 1 es m3s efectivo que el f3rmaco 2.

De lo expuesto anteriormente, se puede determinar la efectividad de los tratamientos. Ambos tratamientos otorgan a los huesos con un umbral m3nimo de dureza, que es en la mayor3a de los casos superior al del grupo de control. El m3nimo incrementado es constante y puede ser 3til cuando se busca dar a los huesos una dureza m3nima.

Los peque1os rangos y desviaciones t3picas resaltan la validez del uso de estos tratamientos en el caso de que se quiera incrementar la dureza de los huesos. Ambos tratamientos son v3lidos a la hora de restaurar la dureza de los huesos, pero la efectividad var3a en funci3n del 3rea que se analice. El f3rmaco 2 es m3s efectivo en la cabeza superior del f3mur izquierdo. Por lo dem3s, el f3rmaco ofrece mejores resultados generales. Por esta raz3n, en t3rminos de dureza, el f3rmaco 1 ser3a el m3s efectivo; a no ser que la dureza que debiera restaurarse principalmente fuera la de la cabeza superior del f3mur izquierdo, en cuyo caso el f3rmaco 2 es m3s adecuado.

1.4.2.2. M3dulo de elasticidad

Otro par3metro obtenido a partir de los ensayos de ultra-micro indentaci3n es el m3dulo el3stico. Este par3metro se us3 para comparar la deformaci3n de las distintas muestras. Los m3dulos el3sticos de indentaci3n de los f3mures derechos e izquierdos se pueden ver en las gr3ficas que siguen a continuaci3n. Las barras representan el valor medio del m3dulo el3stico de indentaci3n para las zonas cortical y trabecular de cada grupo de estudio. Sobre cada barra se incluyen el valor num3rico de la media acompa1ado de la desviaci3n t3pica (representada mediante una barra proporcional a su valor).

Los valores de m3dulo de elasticidad obtenidos en los f3mures izquierdos son muy parecidos entre s3, lo que demuestra que las diferencias entre grupos son relativamente peque1as. Los mayores valores se obtuvieron para el tejido cortical de los f3mures del grupo de control. A continuaci3n se encuentran los huesos tratados con el f3rmaco 2, seguidos de cerca por los tratados con el f3rmaco 1, pero la diferencia no es significativa. El comportamiento visto para la zona cortical se repite en la zona trabecular, aunque con valores inferiores del m3dulo el3stico.

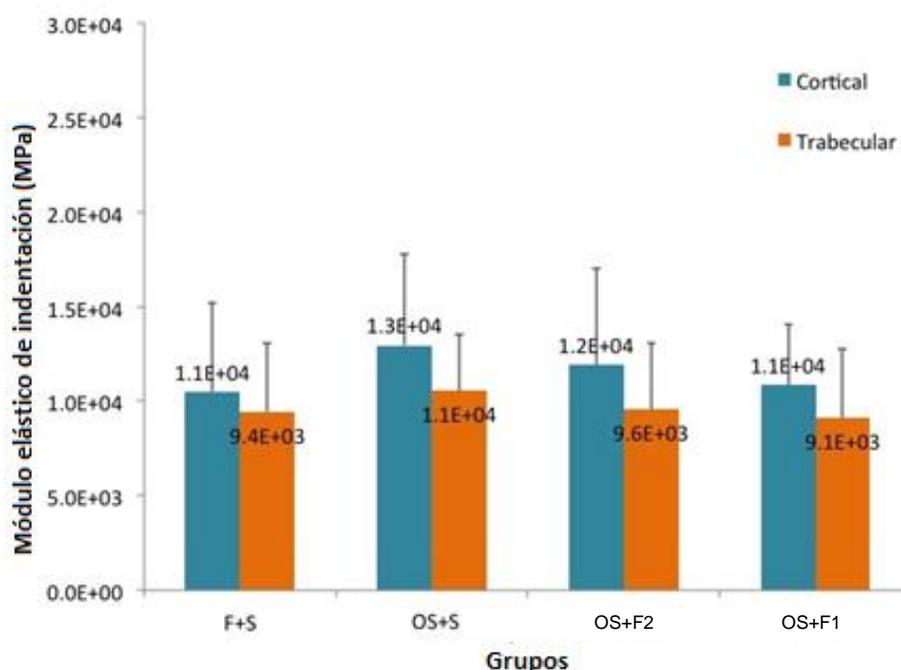


Figura 31 - M3dulos de indentaci3n de los f3mures izquierdos

As3, en lo referente a los f3mures izquierdos, los valores de m3dulo el3stico se mantienen bastante constantes, lo que tiene sentido puesto que esta magnitud es intr3nseca del material. De la misma manera, las desviaciones t3picas obtenidas tanto para el tejido cortical como para el trabecular son bajas. Si tenemos en cuenta el m3dulo el3stico de indentaci3n de los f3mures izquierdos, ning3n tratamiento destaca, de manera que no podemos afirmar cu3l es m3s efectivo. Sin embargo, el an3lisis de los f3mures derechos permite tener una visi3n m3s clara de la efectividad de los tratamientos.

En la gr3fica que sigue a este p3rrafo, se muestran los valores de m3dulo el3stico de indentaci3n obtenidos para los f3mures derechos, que muestran claras diferencias entre los distintos grupos. El m3dulo el3stico para la zona cortical del grupo de control es significativamente m3s bajo que el obtenido para los dos tratamientos.

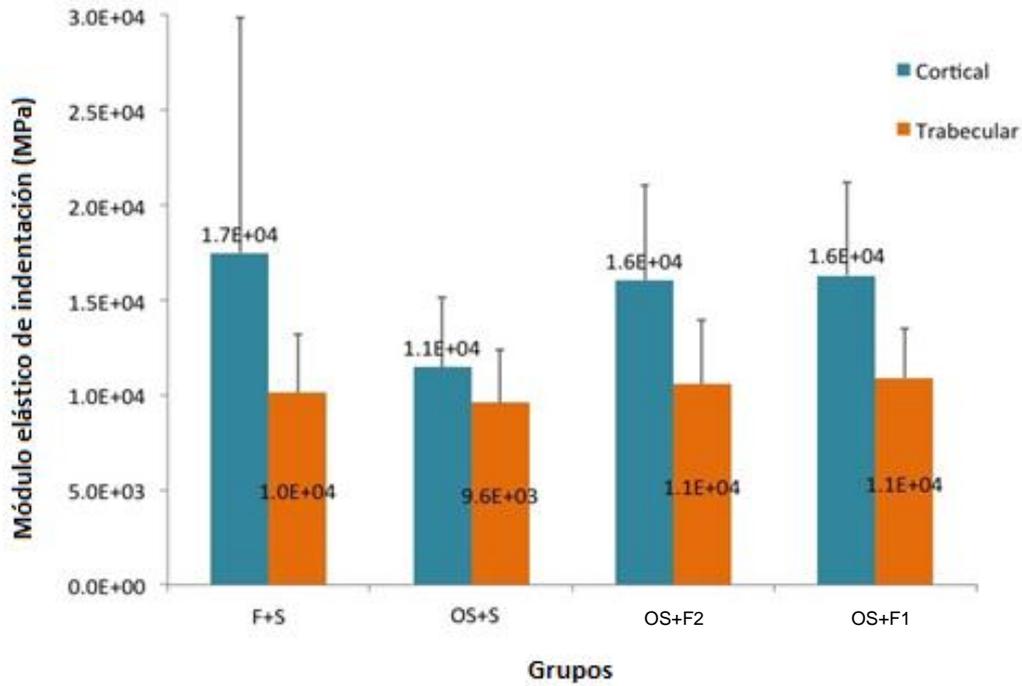


Figura 32 - M3dulos de indentaci3n de los f3mures derechos

En los huesos que fueron sometidos a la osteotomía de sustracci3n, los tratamientos incrementan el m3dulo el3stico a valores similares a los del grupo con fractura normal. La diferencia entre los resultados de los tratamientos y los resultados del grupo de control es menos evidente si centramos la atenci3n en el tejido trabecular. Las desviaciones t3picas son bajas salvo para el tejido cortical del grupo F+S, donde se sospecha que hay una contaminaci3n del an3lisis estadístico por incorporaci3n de una muestra err3nea.

Así, los tratamientos incrementan el m3dulo el3stico de los f3mures derechos (sometidos a la osteotomía de sustracci3n), mientras que los f3mures izquierdos no se ven afectados. Un mayor m3dulo de elasticidad otorga a los f3mures derechos la capacidad de soportar mejor las cargas sin deformar (mayor rigidez), facilitando así la remodelaci3n 3sea necesaria. Tanto el fármaco 1 como el fármaco 2 otorgan a los huesos una mejora del m3dulo el3stico; especialmente a los f3mures derechos, que ven su m3dulo de elasticidad incrementado a valores similares a los del grupo F+S. EN el

caso del m3dulo de elasticidad, ambos tratamiento tienen la misma efectividad.

La eficacia de los tratamientos estudiados varía en funci3n de las zonas y los par3metros que se estudian. Por ello, para poder determinar cu3l de los dos tratamientos es mejor, se deben evaluar todos los par3metros que hayan sido analizados.

1.4.3. Ensayos de impacto Charpy

Los ensayos Charpy son conceptualmente m3s f3ciles de entender. Simulan un impacto y son destructivos, por lo que en este caso s3lo se puede realizar un ensayo para cada muestra (en nuestro caso dos tibias y 12 ratas, luego 24 ensayos). Como ya se ha explicado anteriormente, el inter3s que tiene la realizaci3n de estos ensayos es que simulan de forma m3s realista las condiciones en las que habitualmente se producen las roturas diafisarias de los huesos largos. En los apartados que siguen, se estudian tanto la resiliencia como la energía absorbida por el hueso hasta la rotura.

1.4.3.1. Energía

A continuaci3n, se representan en tres gr3ficas los promedios de energía absorbida durante el ensayo de las tibias izquierdas, derechas y la media conjunta.

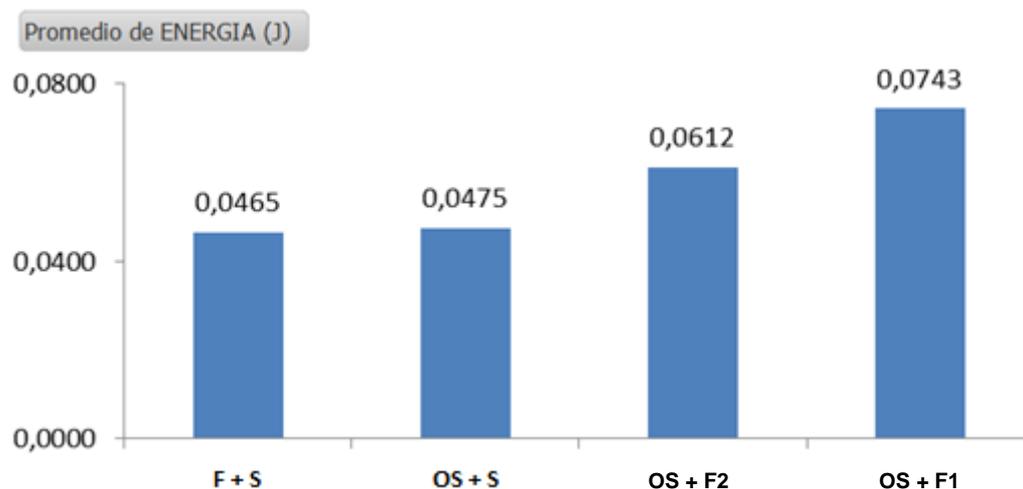


Figura 33 - Promedio de energ3a absorbida por las tibias derechas

Como se observa en la gr3fica, en t3rminos de energ3a absorbida no existe una gran diferencia entre las tibias de ratas cuyos f3mures han sido operados o no. Este resultado cobra sentido al pensar que son huesos que no han sido tratados ni sometidos a ninguna cirug3a espec3fica. El grupo tratado con el f3rmaco 2 ve aumentada su capacidad de absorber energ3a, pero una vez m3s es el f3rmaco 1 el que destaca por su gran mejora de la variable estudiada, como viene siendo hasta ahora.

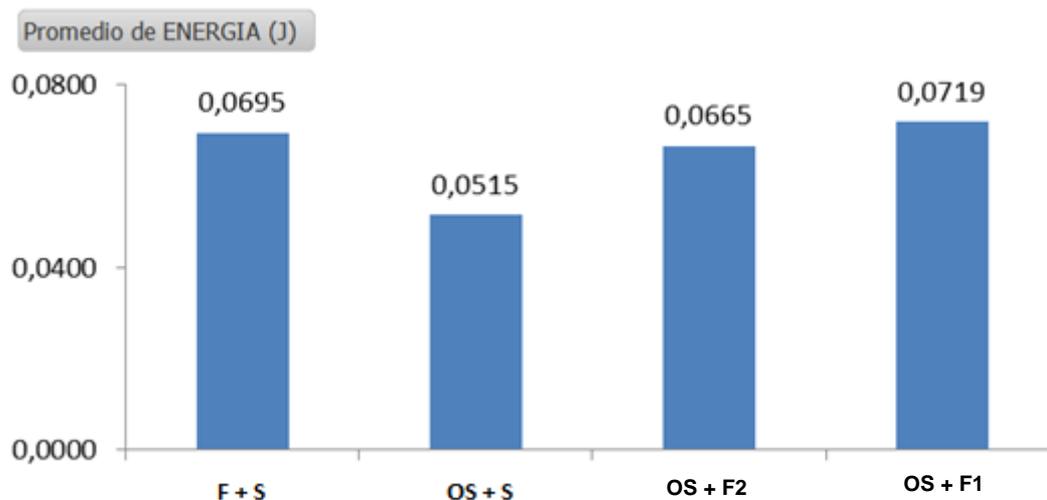


Figura 34 - Promedio de energ3a absorbida por las tibias izquierdas

En este caso s3 que se aprecia una disminuci3n de la capacidad mec3nica del hueso en las ratas sometidas a la osteotom3a. Este resultado es achacable a las diferencias gen3ticas entre los animales empleados. Sin embargo, si nos centramos en los animales que han sido operados; se observa un incremento progresivo de la capacidad de absorci3n energ3tica de las tibias que se corresponde con la mejora del resto de propiedades estudiadas hasta ahora en funci3n de los f3rmacos administrados.

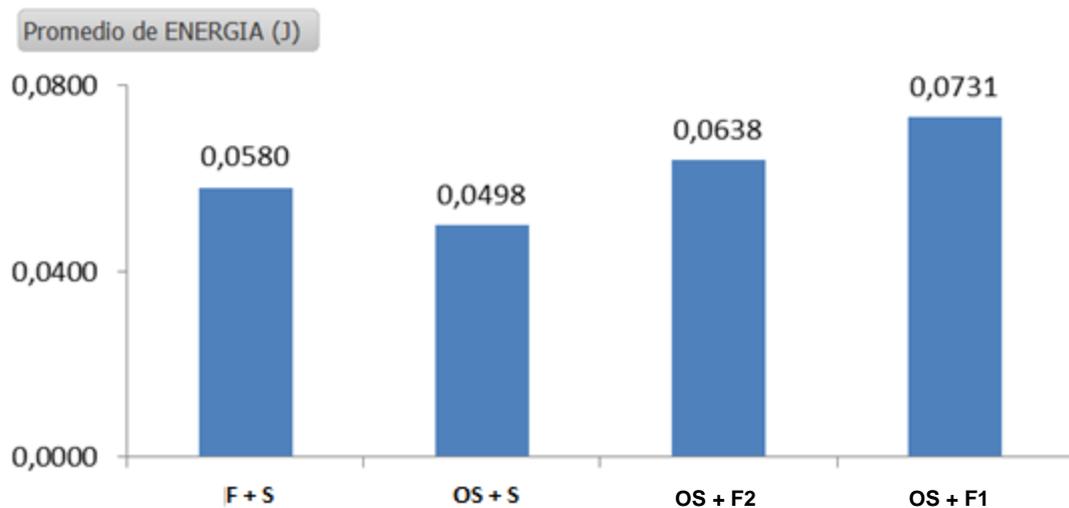


Figura 35 - Energ3a promedio absorbida por todas las tibias

El objetivo de esta gr3fica es el tener una perspectiva de conjunto, puesto que si observamos los valores absolutos de energ3a absorbido por las tibias; se observa que salvo para el f3rmaco 1, las tibias derechas tienen menor capacidad de absorci3n de energ3a que las izquierdas. Es dif3cil decir cu3l es la causa de estas diferencias, puesto que el metabolismo 3seo es extremadamente complejo; pero la evidencia a la vista de los resultados obtenidos es que el f3rmaco 1 una vez m3s es altamente superior al f3rmaco 2 y, por supuesto, sus propiedades son tambi3n superiores a las del hueso sin tratar.

1.4.3.2. Resiliencia

Como una forma de no sesgar los resultados anteriormente obtenidos en funci3n del tama1o de la muestra, se calcul3 tambi3n la resiliencia de las tibias. La divisi3n se ha hecho de nuevo en tibias derechas e izquierdas y se ha incluido una gr3fica que las considera todas.

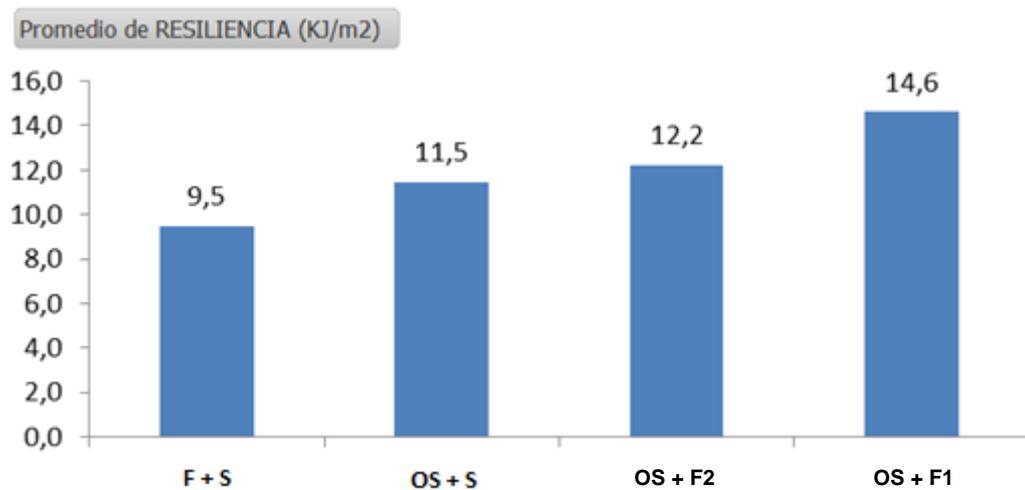


Figura 36 - Resiliencia media absorbida por las tibias derechas

Se observa que la evoluci3n de la resiliencia es semejante a la de la energ3a absorbida, lo que significa que no hab3a grandes variaciones de tama1o entres las tibias de los distintos animales.

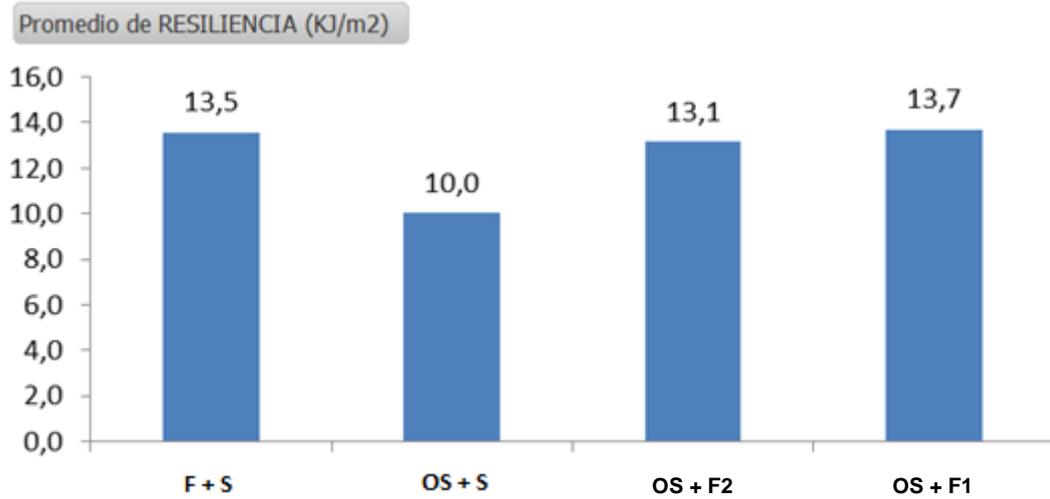


Figura 37 - Resiliencia media de las tibias izquierdas

Considerando lo anteriormente planteado, se llega a la misma conclusi3n respecto al tama1o de las tibias. Teniendo esto en cuenta, la interpretaci3n de la gr1fica es semejante a la de la energa.

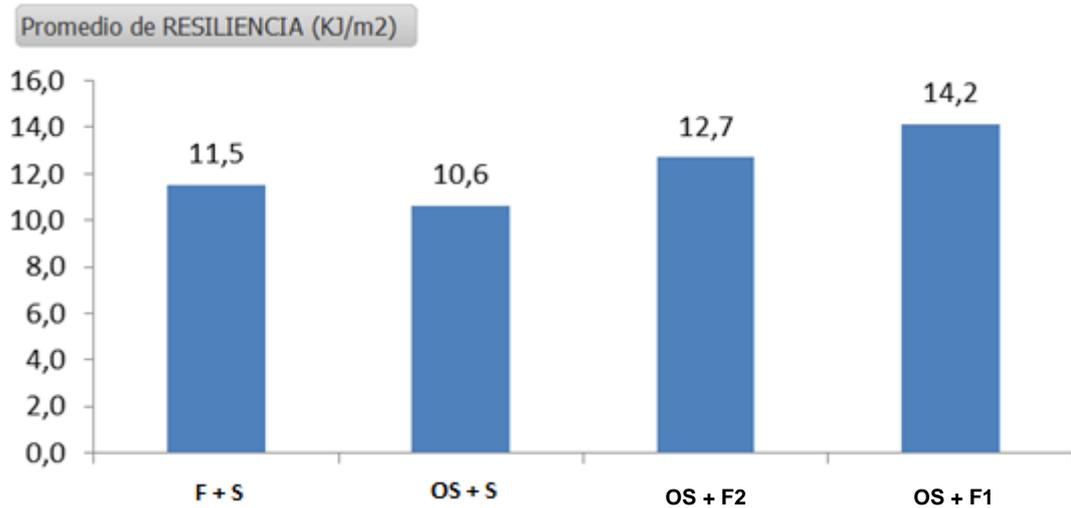


Figura 38 - Resiliencia media de todas las tibias

1.5. Conclusiones

A partir del estudio de los resultados expuestos anteriormente, se llega a la conclusi3n de que los m3todos tradicionales de ensayo de materiales inertes son v3lidos para la evaluaci3n de materiales biol3gicos.

Como se observa a lo largo de la exposici3n de resultados, existe una alta variabilidad en los mismos dentro de cada grupo de estudio. Los motivos principales de esta alta variabilidad son uno externo: la heterogeneidad de las muestras estudiadas a3n cuando se han tomado todas las medidas posibles para que esa heterogeneidad fuera m3nima; y otro interno: la influencia de la gen3tica de cada animal, que condiciona al mismo a reaccionar de formas distintas a los tratamientos. De esta forma, debemos aceptar la variabilidad como algo natural; pero no debemos perder de vista que las tendencias generales son las que marcan el camino que debemos seguir. De esta forma podr3amos decir que aceptamos la variabilidad como consecuencia de las distintas formas de reaccionar de un sujeto a un determinado tratamiento, pero que las tendencias obtenidas son la consecuencia de la acci3n del f3rmaco.

En este caso se han estudiado dos f3rmacos, cuya efectividad ha sido evaluada mediante ensayos de flexi3n e indentaci3n (anteriormente validados), a lo que se ha a3nado un nuevo ensayo hasta ahora no realizado (el ensayo Charpy).

Centr3ndonos en un principio en los ensayos de flexi3n e indentaci3n, los resultados son altamente concluyentes en un aspecto. El f3rmaco 1 otorga al hueso (ya est3 sometido a un proceso de remodelaci3n o no) unas propiedades mec3nicas altamente superiores a las del f3rmaco 2. Es m3s, se dan varios casos en los que el incremento de las propiedades por parte del f3rmaco 1 es tan alto, que huesos sometidos a osteotom3a de sustracci3n presentan resultados superiores a los obtenidos para huesos que han sido sometidos 3nicamente a fractura simple (y no tratados).

Haciendo un an3lisis de la fuerza m3xima en rotura de los huesos operados y tratados y enfrentando esos valores a la longitud de la separaci3n entre las partes del hueso restantes tras la operaci3n de simulaci3n de pseudoartrosis se obtiene la siguiente gr3fica.

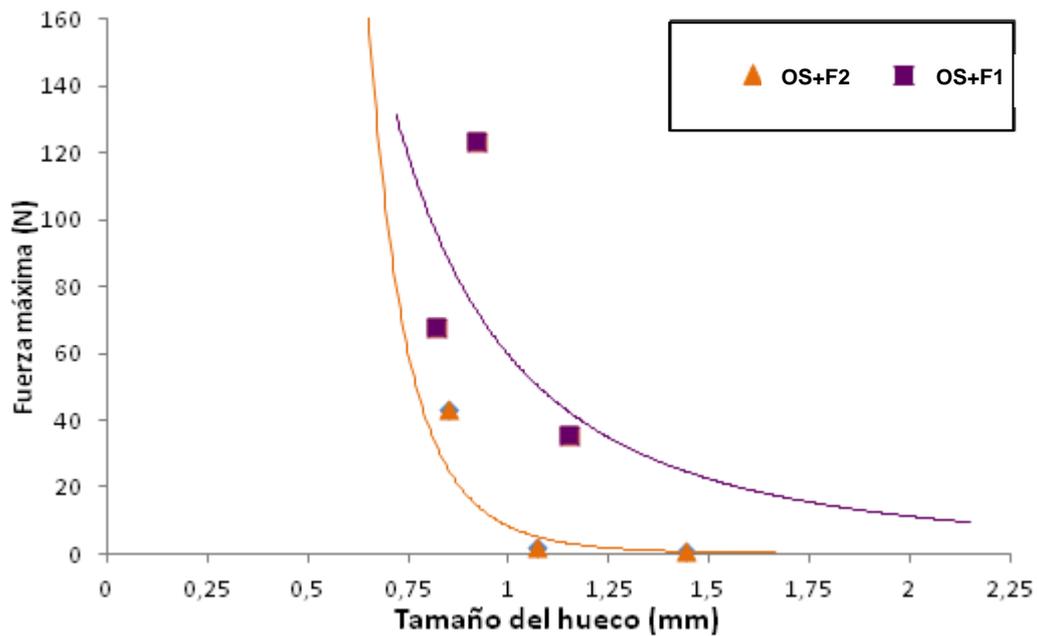


Figura 39 - Relaci3n entre las fuerzas m3ximas y los huecos y aproximaciones gr3ficas

Si bien las l3neas de tendencia est3n basadas 3nicamente en tres valores, se hace evidente que el f3rmaco 1 es superior en cuanto a favorecimiento de la remodelaci3n. Para una distancia entre las partes superior e inferior del hueso de entorno a 0'8 mm se obtiene que la fuerza m3xima obtenida para el f3rmaco 1 supera a obtenida para el f3rmaco 2 en m3s de un 50 %. De la misma manera, se obtienen valores de fuerza m3xima semejantes para huecos de 0'8 mm para el f3rmaco 2 y 1'2 mm para el f3rmaco 1. Esta es una forma visual de relacionar dos par3metros de naturaleza distinta. Uno de ellos (la distancia entre las partes del hueso) viene impuesto desde el comienzo del tratamiento, mientras que la fuerza m3xima obtenida es medida una vez el tratamiento termina.

Las mismas conclusiones a las que se llega mediante el an3lisis de la fuerza m3xima se obtienen si nos fijamos en la energ3a almacenada y la rigidez del hueso. En el caso de la energ3a el f3rmaco 2 parece hacer disminuir la capacidad del hueso de absorber energ3a con respecto a la capacidad del hueso sin tratar. De la misma manera, el hueso operado y sin tratar absorbe mayor energ3a que el sometido a fractura simple y sin tratar. Se considera que esto se debe a que el cayo como formaci3n visco-el3stica de gran tama3o tiene unas propiedades de absorci3n de energ3a superiores a las de un hueso fracturado que no tuviera el callo (que ser3a menos tenaz). Es en los valores de rigidez donde se obtienen los resultados que podr3an parecer, a priori, m3s l3gicos, puesto que el grupo OS+S da peores resultados que el F+S, y los dos grupos tratados presentan mejoras en el valor de rigidez, siendo una vez m3s el f3rmaco 1 superior al f3rmaco 2.

En lo referente a los resultados obtenidos en los ensayos UMI, el primer resultado en que nos fijamos es en que la dureza cortical es superior a la trabecular como era esperado, lo que confirma que estos ensayos devuelven resultados fiables. En lo referente a la eficacia de los f3rmacos, debemos tener presente el an3lisis en base al par3metro p estudiado. Como ya se ha explicado en el propio apartado de resultados, un valor del par3metro p inferior a 0,05 indica que los grupos contrastados son significativamente diferentes y por lo tanto las conclusiones derivables de su an3lisis realistas. Lo contrario ocurre con aquellos grupos para los cuales el par3metro p tiene un valor superior al citado. As3, observamos que en los grupos de muestras en los que el valor de p nos permite considerar que los grupos son significativamente distintos, los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado salvo en el caso de la dureza trabecular de las cabezas inferiores de los f3mures izquierdos y la dureza cortical de las cabezas superiores de los f3mures izquierdos. Siendo estos dos los 3nicos casos particulares en los que se encuentran valores no concordantes, se achaca esta desviaci3n a la gen3tica propia de los animales y sus circunstancias particulares dentro del equilibrio aportado por el equipo que se encarg3 de su cr3a.

Por 3ltimo, y pasando de las consideraciones est3ticas a las din3micas, los ensayos Charpy arrojan resultados positivos sobre la validez de este tipo de ensayos. Como se observa en la gr3fica de las resiliencias correspondientes al conjunto de todas las tibias, los resultados son los que el equipo m3dico esperaba desde un principio. Las tibias correspondientes a sujetos cuyos f3mures hab3an sido sometidos a una osteotom3a de sustracci3n y tratados con placebo presentan menor capacidad de absorci3n de energ3a que las tibias de sujetos sometidos a fracturas simples. Entrando en el conjunto de tibias de animales tratados, una vez m3s el f3rmaco 1 presenta unos resultados superiores a los del f3rmaco 2, pero en este caso el f3rmaco 2 mejora la capacidad del hueso de absorber energ3a. En lo referente a la eficacia de los f3rmacos, lo deducible de los resultados obtenidos de los ensayos mec3nicos realizados est3 en plena concordancia con lo que los m3dicos que dise1naron los tratamientos observaron desde su 3mbito, a saber: el f3rmaco 1 es tremendamente eficaz para el tratamiento de cualquier tipo de condici3n 3sea, mientras que el f3rmaco 2 aporta resultados positivos a la actividad regenerativa de los huesos siempre y cuando partan de un estado "saludable", lo que explica que no sea un tratamiento efectivo para el tratamiento de fracturas, pero s3 de otras condiciones como p3rdida de masa 3sea.

En definitiva este estudio nos permite concluir que los ensayos llevados a cabo son v3lidos en la determinaci3n de las propiedades mec3nicas (est3ticas y din3micas) de huesos. Si bien la variabilidad es alta en algunos casos, las tendencias estad3sticas son claras. La utilizaci3n de un n3mero mayor de animales podr3a haber arrojado algo m3s de luz sobre ciertos aspectos que pueden haber pasado por alto, pero ese es un trabajo a largo plazo que se deja para el futuro. Adem3s, no cabe duda a la vista de los resultados aqu3 presentados, de que el f3rmaco 1 es mucho m3s recomendable en el tratamiento de huesos fracturados que el f3rmaco 2, con lo que adem3s de todos los resultados positivos citados, podemos a1adir uno m3s que es que la eficacia de un f3rmaco en t3rminos mec3nicos ha sido probada cient3ficamente y no s3lo intuida a trav3s de las consecuencias de casos cl3nicos acumulados.

2. Presupuesto

CUADRO DE PRECIOS N3 1			
N3MERO PRECIO	DESIGNACI3N	PRECIO UNITARIO	
		EN CIFRA (euros)	EN LETRA (euros)
1.1	MEDICAMENTOS Y FUNGIBLES	PRECIO/UNIDAD	
1.1.1	<i>F3rmaco 2</i>	6000,0	<i>Seis mil</i>
1.1.2	<i>F3rmaco 1</i>	4000,0	<i>Cuatro mil</i>
1.1.3	<i>Suero</i>	300,0	<i>Trescientos</i>
1.1.4	<i>Material Quir3rjico para extracci3n de huesos</i>	750,0	<i>Setecientos cincuenta</i>
1.1.5	<i>L3quido Viafix para embutido en frio</i>	450,0	<i>Cuatrocientos cincuenta</i>
1.1.6	<i>Polvo Viafix para embutido en frio</i>	350,0	<i>Trescientos cincuenta</i>
1.1.7	<i>Discos de pulido metalogr3ficos</i>	200,0	<i>Doscientos</i>
1.2	VALIDACI3N DE ENSAYOS	PRECIO/ENSAYO	
1.2.1	<i>Ensayo de flexi3n</i>	30,0	<i>Treinta</i>
1.2.2	<i>Ensayo de UMI</i>	50,0	<i>Cincuenta</i>
1.2.3	<i>Ensayo de impacto Charpy</i>	28,0	<i>Veintiocho</i>

CUADRO DE PRECIOS N3 2				
N3MERO DE PRECIO	DESIGNACI3N	N3 UNIDAD	PRECIO UNITARIO (euros)	IMPORTE (euros)
1.1.	MEDICAMENTOS Y FUNGIBLES			
1.1.1	<i>F3rmaco 2</i>	1	6000,0	6.000,0
1.1.2	<i>F3rmaco 1</i>	1	4000,0	4.000,0
1.1.3	<i>Suero</i>	1	300,0	300,0
1.1.4	<i>Material Quir3rjico para extracci3n de huesos</i>	1	750,0	750,0
1.1.5	<i>L3quido Viafix para embutido en frio</i>	1	450,0	450,0
1.1.6	<i>Polvo Viafix para embutido en frio</i>	1	350,0	350,0
1.1.7	<i>Discos de pulido metalogr3ficos</i>	1	200,0	200,0
TOTAL MEDICAMENTOS Y FUNGIBLES				12.050,0
1.2.	VALIDACI3N DE ENSAYOS			
1.2.1	<i>Ensayo de flexi3n (rata)</i>	24	30,0	720,0
1.2.2	<i>Ensayo de UMI</i>	1008	50,0	50400,0
1.2.3	<i>Ensayo de impacto Charpy</i>	24	28,0	672,0
TOTAL VALIDACI3N DE ENSAYOS				51792,0

PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

1. MEDICAMENTOS Y FUNGIBLES12.050,0 €

2. VALIDACIÓN DE ENSAYOS.....51.792.0 €

TOTAL PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL63842,0 €

PRESUPUESTO DE EJECUCION POR CONTRATA

PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL63842,0 €

GASTOS GENERALES (3 %)1915,3 €

BENEFICIO INDUSTRIAL-

TOTAL PARCIAL65757,3 €

PROYECTO Y DIRECCIÓN DE OBRAS (7%).....-

IVA (21%).....13809 €

TOTAL PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA.....79566,3 €

El presupuesto estimado para llevar a cabo este trabajo asciende a un total de **Setenta y nueve mil quinientos sesenta y seis euros y treinta céntimos de euro.**

3. Bibliografía

- [1] Dr. Alejandro 3lvarez L3pez, Dr. Carlos Casanova Morote y Dra. Yenima Garc3a Lorenzo. (2004). Fractura diafisarias abiertas de tibia. *Revista cubana de ortopedia y traumatolog3a*.
- [2] Kierszenbaum, A. L. Histolog3a y biolog3a celular. Elsevier, segunda edici3n. 2008
- [3] Anatom3a de Gray, tomo 1. Churchill livingstone, Harcourt brace; trig3simo octava edici3n. 1998
- [4] Platzer, W. Atlas de anatom3a para estudiantes y m3dicos. Tomo 1: aparato locomotor. Ediciones Omega, Barcelona. 2000
- [5]http://escuela.med.puc.cl/publ/OrtopediaTraumatologia/Trau_Secc01/Trau_Secc01_24.html, consultado el 17/03/2014
- [6] Young B., Heath J.W. Histolog3a funcional. Churchill Livingstone, cuarta edici3n. 2000
- [7] http://www.telefuerza.com/sabias_que/archivos/e91faa_femur.jpg, consultado el 20/04/2014
- [8]<http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co27338.html>, consultado el 30/04/2014
- [9] A. Colino, G. Rodr3guez, J. Tejada, L. L3pez-Dur3n. Curso b3sico de pseudoartrosis de la fundaci3n SECOT.