



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO DE INDENTACIÓN PARA DETERMINAR
LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE TEJIDOS MINERALIZADOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

P R E S E N T A

GONZÁLEZ VELÁZQUEZ KARLA STEPHANIE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ

DICTAMINADORES:

DR. ISSAC OBED PEREZ MARTINEZ

MTRO. SAÚL ERNESTO CIFUENTES MENDIOLA

Los Reyes Iztacala, Edo. de México Agosto/2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“La gente habla de conseguir golpes de suerte en sus carreras. Yo soy la prueba de que la teoría de los golpes de suerte es simplemente errónea. Uno consigue su propia suerte. El mundo está dirigido por los que se dan a conocer, no por los que esperan a que se pregunte por ellos”.

Steve Blank,

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos quienes me han acompañado en este largo camino, gracias a ellos por ayudar a convertirme en la mujer que soy ahora, sin ustedes no habría llegado hasta donde estoy ahora, su apoyo y comprensión me han ayudado a recorrer este camino lleno de experiencias muy interesantes, sin ustedes no sería nada de lo que soy ahora, siempre estaré agradecida con ustedes.

Gracias a la Doctora Ana Lilia García Hernández por permitirme ser su alumna y brindarme la confianza para realizar un proyecto de investigación bajo su tutela, por enseñarme que, con esfuerzo, dedicación y disciplina se pueden obtener resultados muy interesantes y sobre todo gratificantes. Muchas gracias doctora Ana, porque con su ayuda, he encontrado este mundo maravilloso de la investigación y gracias a ello, descubrí mi verdadera meta a seguir. Me llevo grandes aprendizajes, entendí la importancia del trabajo en equipo y por, sobre todo, me llevo excelentes amigos, compañeros y experiencias muy gratificantes, que por supuesto, no habría podido experimentar sin su apoyo, por esto y más, muchas gracias.

A mis amigos, gracias por hacer más divertidos mis días como estudiante, por estar cuando lo necesitaba y no solo cuando podíamos divertirnos, por ser mis profesores cuando no entendía algo, por ser mis compañeros de estudio y escucharme cuando me encontré en dificultades.

Un agradecimiento especial a mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme a profesores cuyas clases son de alto nivel académico, así como las aulas y materiales necesarios para desarrollarme como un excelente profesional de la salud.

¡México, Pumas, Universidad!

Por mi raza Hablara el Espíritu.

ÍNDICE

GLOSARIO	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Tejido óseo	9
Composición ósea.....	9
Propiedades biomecánicas óseas.....	10
Alteraciones de las propiedades biomecánicas óseas.	13
Importancia de evaluar las propiedades biomecánicas óseas.....	14
Equipos que se usan para evaluar las propiedades biomecánicas óseas.....	14
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
Desarrollo de sistema de flexión de tres puntos.....	22
Calibración de la fuerza del sensor.....	24
Programación de Arduino y Script en Matlab	24
Animales	27
Proceso de deshidratación	27
Inducción de osteoporosis por deficiencia de hormonas	27
Elaboración de réplicas óseas con materiales dentales	28
Muestras de Resina fotocurable.....	28
Muestras de Resina fluida	28
Muestras de Acrílico	29
Muestras de Yeso	29
Medición de las propiedades biomecánicas en tejido óseo y en materiales dentales	29
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS.....	30
Construcción del sistema de flexión de tres puntos.	30
Desarrollo de interfaz en Matlab y resultado del proceso de la interfaz.....	31
La deshidratación de los huesos disminuye su peso.....	36
Evaluación de las propiedades biomecánicas de los huesos.....	38

El dispositivo construido es capaz de distinguir las alteraciones en las propiedades biomecánicas en huesos deshidratados.	38
El dispositivo es capaz de distinguir los cambios en las alteraciones en las propiedades biomecánicas de huesos osteoporóticos.	44
El dispositivo es capaz de medir las propiedades mecánicas de materiales dentales.	47
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56

GLOSARIO

- **σ** : Esfuerzo
- **AUC**: Área de bajo de la curva
- **BSP**: Sialoproteína ósea
- **Cx Sham**: Cirugía simulada
- **δ** : Desplazamiento
- **DXA**: Absorciometría de rayos X
- **ϵ** : Deformación
- **E**: Modulo de elasticidad
- **EDTA**: Acido etilendiaminotetraacético
- **HA**: Hidroxiapatita
- **I**: Inercia
- **Micro-CT**: Microtomografía computarizada
- **MPa**: Mega pascales
- **N**: Newtons
- **OCN**: Osteocalcina
- **OPN**: Osteopontina
- **OVX**: Ovariectomía
- **PBS**: Buffer de fosfato salina
- **P. frac**: Carga máxima
- **P. max**: Fuerza máxima
- **P (N)**: Carga aplicada
- **PNC**: Proteínas no colágenas
- **PQCT**: Tomografía computarizada cuantitativa periférica
- **SD**: Desviación estándar
- **TC**: Tomografía computarizada

RESUMEN

El hueso posee propiedades biomecánicas que son las características que presenta ante estímulos externos como cargas o fuerzas aplicadas al hueso como la elasticidad, plasticidad, rigidez, flexibilidad y viscoelasticidad. Las propiedades biomecánicas óseas se pueden ver drásticamente afectadas si uno o más de los elementos que lo componen aumentan o disminuyen su presencia. Para el análisis de las propiedades biomecánicas óseas se han desarrollado diferentes sistemas; de ellos, el que ha proporcionado mayor reproducibilidad es el sistema de flexión de tres puntos. El manejo de este tipo de equipos requiere de personal especializado, son costosos y es necesario un amplio espacio para su colocación, además los análisis matemáticos para obtener los valores de las propiedades biomecánicas se deben hacer de forma manual; todos estos factores son limitantes para el uso del equipo. La evaluación de las propiedades biomecánicas podría predecir el riesgo de fractura ósea. Es importante el desarrollo de dispositivos que posea la capacidad y sensibilidad de medir las propiedades biomecánicas del hueso, que no requiera de personal especializado, que sea de un bajo costo y que los análisis se realicen de forma automatizada. **Objetivo:** Desarrollar y calibrar un dispositivo para medir y determinar las propiedades biomecánicas del hueso de modelos murinos. **Material y métodos:** Se construyó un sistema de flexión de tres puntos con el uso de una prensa eléctrica construida en el CINVESTAV a la que se adaptó un sensor de presión con un vástago y una base de metal ajustable. El sistema se conectó a un sistema Arduino para registrar las fuerzas y se desarrolló un programa en Matlab en colaboración con el laboratorio de neurobiología de la FES Iztacala, que permite el cálculo de propiedades biomecánicas óseas por medio de ecuaciones. Se evaluaron las propiedades biomecánicas de fémur y tibias deshidratados *ex vivo* de ratones BALB/C. Se evaluaron las propiedades biomecánicas también en fémur y tibias de ratones C57BL/6 con osteoporosis provocada por deficiencia de estrógenos. Para probar la sensibilidad de equipo, se realizó además una comparación en la resistencia de algunos materiales de uso odontológico como la resina polimérica, resina fluida, yeso tipo III. **Resultados:** Se logró la confección de un sistema de flexión de tres puntos, con un bajo costo de producción que permite la evaluación directa y sencilla de las propiedades biomecánicas óseas. Los huesos deshidratados, tuvieron una menor resistencia y aumentaron su fragilidad. Los huesos de ratones con osteoporosis, tuvieron una carga máxima y punto de fractura similar a los huesos sanos, sin embargo, tiene una menor resistencia a la fractura. Con respecto a las muestras confeccionadas con materiales de uso odontológico, los resultados mostraron la resina tienen una capacidad de soportar cargas considerables a pesar de no ser tan resistentes. **Conclusión:** Pudimos construir un dispositivo de flexión de tres puntos lo suficientemente sensible para detectar diferencias en las propiedades biomecánicas de huesos deshidratados, huesos con osteoporosis y capaz de determinar las propiedades mecánicas de otros materiales. Este sistema puede ser usado para el estudio del riesgo de fractura en modelos murinos.

ABSTRACT

The bone possesses biomechanical properties such as, elasticities, plasticity, rigidity, flexibility, and viscoelasticity. These properties are closely linked to the structural composition of bone such as calcium or vitamin D deficiency that can lead to the development of osteopathies. Different systems have been developed for analysing the different biomechanical properties of the bone. For example, the three-point bending. However, the handling of this type of equipment requires specialized personnel, and also, they are expensive, and space consuming. In addition, the mathematical analysis to obtain the values of elasticity, plasticity, rigidity or flexibility must be done manually. All these factors are important limitations for the analysis of the biomechanical properties of bone. Accurate evaluation of biomechanical properties could predict fracture risk and evaluate quality. Therefore, it is important to develop devices with the capacity and sensitivity to measure the biomechanical properties of bone, userfriendly and cost-effective. **Objective:** To develop and calibrate a device to measure and determine the biomechanical properties of bone. **Material and methods:** A three-point bending system was built with the use of an electric press to which a pressure sensor with a stem and an adjustable metal base was adapted. The system was connected to an Arduino system to register the forces and developed a program in Matlab that allows the calculation of bone biomechanical properties using equations. The biomechanical properties of the femur and dehydrated tibias *ex vivo* of BALB / C mice were evaluated. The biomechanical properties were also evaluated in the femur and tibias of C57BL / 6 mice with osteoporosis caused by estrogen deficiency. The sensitivity of equipment was corroborated, also with the measure of resistance of some dental materials such as, polymer resin, fluid resin, type III plaster. **Results:** The achievement of a three-point flexion system was achieved, with a low production cost that allows the direct and straightforward evaluation of bone biomechanical properties. With respect to the samples analyzed in the system, it was observed that the biomechanical bone properties can be directly affected according to the structural composition of the bone; the samples that were dehydrated, decreased their resistance and increased their fragility, presenting a low level of deformation before the fracture, on the other hand. The results obtained from bones with osteoporosis showed that there is a behavior similar to that of healthy bones, presenting a maximum load and fracture point similar to these; However, the resistance is drastically diminished compared to a healthy bone. The samples made with resin have a capacity to withstand higher loads despite not being so resistant. **Conclusion:** We were able to construct a three-point bending device sensitive enough to detect differences in the biomechanical properties of dehydrated bones, bones with osteoporosis, and able to determine the mechanical properties of other materials. This system can be used for the study of bone biology, the assessment of bone quality and the risk of fracture in different study conditions such as diabetes, sedentary lifestyle, exercise, bioelectric stimulation, etc.

INTRODUCCIÓN

Tejido óseo.

Este tejido está formado por células especializadas (células osteoprogenitoras, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) y material intercelular calcificado o matriz ósea. Los osteocitos se sitúan en cavidades o lagunas en el interior de la matriz. Los osteoblastos sintetizan la parte orgánica de la matriz y los osteoclastos son células gigantes móviles y plurinucleadas que reabsorben el tejido óseo participando en el proceso de remodelación de los huesos (1).

El tejido óseo constituye la mayor parte del esqueleto. Sirve de soporte a las partes blandas y protege órganos vitales como la médula ósea. Proporciona apoyo a los músculos esqueléticos, transformando sus contracciones en movimientos útiles y constituye un sistema de palancas que amplía las fuerzas generadas en la contracción muscular. El tejido óseo actúa como depósito de calcio, fosfatos y otros iones que se almacena y se liberan en el tejido en forma controlada, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis de los líquidos orgánicos (1).

Los huesos largos son de forma tubular, con una capa externa fuerte, o capa cortical, que rodea un núcleo más suave y esponjoso llamado hueso trabecular (1). La combinación hace que estos huesos sean fuertes y ligeros, pero lo suficientemente flexibles como para absorber el estrés de los ejercicios de alto impacto, sin romperse. La remodelación diaria conduce a una reestructuración gradual del hueso. La reabsorción de los minerales en el interior de la capa cortical y en la propia cavidad ósea conduce a una pérdida inexorable de hueso trabecular y un ensanchamiento de la cavidad ósea. Esto se compensa en parte con la adición gradual de capas adicionales de mineral al exterior de la capa cortical (2).

Composición ósea

El tejido óseo está constituido por dos fases: una fase inorgánica (mineral) y una fase orgánica.

La fase inorgánica está compuesta por hidroxiapatita (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (3). Este mineral está compuesto por calcio (Ca), fosfato (Po) y un grupo hidroxilo (OH), sin embargo, también puede contener impurezas como los iones de carbonato que pueden sustituir a los grupos hidroxilo y fosfato (3).

Además de carbonato que sustituye a los grupos fosfato, también se forman otras sustituciones, como potasio, magnesio, estroncio y sodio que sustituyen el Ca^{2+} , y cloruro y fluoruro que sustituyen los grupos hidroxilo. El fluoruro, aumenta la cristalinidad de la apatita, siendo así que las impurezas generalmente reducen la cristalinidad, trayendo como consecuencia que el mineral óseo se vuelva más soluble, lo que es esencial para la homeostasis mineral y la remodelación ósea. (3)

La fase orgánica está compuesta por colágena y proteínas no colágenas (PNC). De los 29 tipos de colágena identificados, la colágena tipo I es la más abundante no solo del cuerpo, sino también en el tejido óseo la colágena tipo I constituye del 90–95% de la masa orgánica del hueso (4) participa activamente en el control de la mineralización, además, la colágena tipo I puede afectar las características estructurales del hueso en una escala atómica, controlando el tamaño y la distribución tridimensional de la apatita (4). La resistencia a la tracción, la rigidez y el soporte de carga están respaldados por la colágena tipo I formando parte de la fase orgánica, también podemos encontrar a las proteínas no colágenas como lo son la sialoproteína ósea (BSP), la osteonectina, la osteopontina (OPN) y la osteocalcina (OCN) (4). La BSP es una fosfoproteína que contiene varios segmentos de ácido poliglutámico responsables de la unión a la hidroxiapatita, ayuda al activador del receptor de la reabsorción ósea mediante la inducción de osteoclastogénesis y la promoción de la supervivencia de los osteoclastos (5). La osteopontina desempeña un papel importante en la morfogénesis ósea, durante la remodelación ósea, la OPN ayuda a anclar los osteoclastos a la matriz mineral del hueso (5). La OCN está estrechamente alineada con la colágena tipo I, además puede influir en la formación ósea a través de la capacidad para unirse a los minerales (5). La OCN se expresa mediante osteoblastos y regula cambios estructurales en el sistema óseo, estudios han demostrado que la pérdida de osteocalcina puede dar como resultado un grosor y densidad aumentadas (6), controla, directa o indirectamente, la masa, tamaño de mineral y su orientación (7).

El tejido óseo posee propiedades biomecánicas que están íntimamente ligadas a su composición estructural, esto es debido a las interacciones que existen entre todos los elementos que lo componen y su fisiología (reabsorción, aposición ósea y la mineralización), todo esto influye en la cantidad y calidad de hueso, por consiguiente, en su morfología y sus propiedades biomecánicas (7).

Propiedades biomecánicas óseas

Se definen como propiedades biomecánicas a las características que presentan los elementos biológicos ante estímulos externos (cargas o fuerzas). Los términos utilizados para describir las propiedades mecánicas de los huesos son diferentes de los utilizados para describir las propiedades mecánicas a nivel del tejido, la principal diferencia entre estos dos niveles, son las escalas otorgadas para cada estrato, siendo así que por lo general las propiedades mecánicas del hueso entero se expresan en términos de carga (N) y desplazamiento (mm), mientras que las propiedades mecánicas a nivel del tejido se expresan en términos de tensión (N / mm^2) y torsión (mm / mm o%) (8).

Las propiedades biomecánicas de los huesos se pueden definir de la siguiente forma:

- Elasticidad
- Plasticidad
- Rigidez
- Flexibilidad
- Viscoelasticidad

La elasticidad es la propiedad del hueso de recuperar su forma inicial una vez que deja de aplicarse sobre él una fuerza.

La plasticidad es la propiedad opuesta a la elasticidad, ya que la deformación plástica se mantiene incluso cuando deja de aplicarse la fuerza, un ejemplo de material elástico es el caucho, mientras que un material plástico es la plastilina.

La elasticidad y la plasticidad se pueden expresar matemáticamente de la siguiente forma:

$$elasticidad = \sigma_{ult} - \sigma_y$$

$$plasticidad = (\sigma_{ult} - \sigma_y) / \sigma_{ult}$$

En donde, El punto de transición entre la región elástica y la región plástica se denomina punto de vencimiento o cesión (*yield point*), que corresponde con la deformación de vencimiento (*yield strain*, ϵ_y) y con el esfuerzo de vencimiento o resistencia elástica máxima (*yield stress*, σ_y), que estima la capacidad de un material de deformarse sin sufrir microfrazuras. En una región determinada de la región plástica aparece el punto que corresponde con el esfuerzo máximo (*ultimate stress*, σ_{ult}), a partir del cual se producen microfrazuras responsables de que aun con una disminución del esfuerzo, se incremente la deformación sufrida por la muestra.

La rigidez es la propiedad de los materiales que se expresa como la aplicación de una fuerza o carga para causar una pequeña deformación elástica, un ejemplo de esto es una barra de hierro, que requiere la aplicación de una gran carga para lograr obtener una pequeña deformación. Corresponde a la pendiente de la región elástica de la curva carga-desplazamiento (rigidez extrínseca, *extrinsic stiffness*, S), expresada en N/m; o de la curva esfuerzo-deformación (módulo de elasticidad o de Young, E), expresada en Pa.

La flexibilidad es la propiedad opuesta a la rigidez, esta propiedad muestra una gran deformación ante la aplicación de cargas mínimas, sin embargo, un material flexible, tiene la capacidad de regresar a su forma original, un ejemplo de esto son las barras de silicón, con pequeñas cargas, sufren grandes

deformaciones y pueden regresar a su estado inicial. Este se calcula a partir del módulo de Young o elástico y es la forma negativa de la rigidez.

La viscoelasticidad es la propiedad de los materiales en la que al aplicar una carga sobre un sólido elástico éste se deforma hasta que la fuerza cesa y la deformación elástica éste se deforma hasta que la fuerza cesa y la deformación vuelve a su valor inicial. Si la carga se aplica sobre un fluido viscoso también se deforma, pero no se recupera, aunque cese la carga. El comportamiento viscoelástico se describe mediante tres variables: el módulo de almacenamiento (*storage modulus, E'*), el módulo de pérdida (*loss modulus, E''*) y la fricción interna (*loss tangent, tan δ*) (9).

Teniendo un conjunto de propiedades biomecánicas, se pueden obtener una serie de mediciones, realizando pruebas de carga y descarga, las mediciones de carga y descarga se describen a continuación:

- Rigidez (N/mm)
- Carga máxima o resistencia total del hueso (N)
- Desplazamiento post carga (mm)
- Trabajo a fractura (Nmm)
- Modulo elástico o módulo de Young ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$)
- Estrés final ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$)
- Tensión post carga (mm/mm)
- Dureza ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$)
- Momento de inercia (8)

La rigidez a pesar de ser una propiedad del hueso también es una característica medible y va a estar dada por la deformación del hueso a aplicarle una carga, a nivel de tejido, la rigidez está representada por el módulo de elasticidad o módulo de Young, que evalúa la resistencia a la deformación del tejido óseo cuando está cargado.

La carga máxima, es la carga o fuerza máxima soportada por una estructura antes de la fractura.

El desplazamiento posterior al rendimiento es la deformación que expresa la materia desde que comenzó a ser aplicada una carga, hasta el momento de fractura.

El trabajo a fractura (energía a fractura) mide el trabajo realizado por la carga aplicada para deformar y fracturar el hueso (también refleja la energía disipada por la estructura ósea antes de romperse), a nivel del tejido, la tenacidad (también llamada módulo de tenacidad) designa el trabajo por unidad de material antes de la fractura (8).

El momento de inercia puede definirse como el movimiento rectilíneo uniforme, refleja la distribución de la masa de un cuerpo respecto a su eje de giro, depende exclusivamente de la geometría del cuerpo y de la posición del eje de giro y no de las fuerzas que intervienen en el movimiento (10).

Alteraciones de las propiedades biomecánicas óseas.

Como se ha mencionado con anterioridad, la composición del hueso le otorga propiedades biomecánicas específicas, que se pueden ver afectadas cuando uno o más de los elementos que lo componen aumentan su presencia o la disminuyen, tal es el caso de algunas osteopatías que afectan las propiedades biomecánicas del hueso, por ejemplo, la osteoporosis, la enfermedad de Paget, enfermedades del desarrollo óseo o la osteopatía diabética, entre otras.

La osteoporosis es un trastorno esquelético que afecta la resistencia ósea (11), es caracterizada por una masa ósea reducida y un deterioro microarquitectónico del tejido óseo con el consiguiente aumento del riesgo de fractura, se relaciona con una predisposición genética, falta de actividad física, deficiencia hormonal, ingesta inadecuada de calcio y vitamina D o el estilo de vida como el abuso de alcohol o uso de corticoesteroides (12).

La enfermedad de Paget es un trastorno de alto remodelado óseo que puede afectar a un solo hueso o a múltiples huesos que conlleva una hipertrofia ósea, expansión cortical y una estructura ósea anormal, responsable de la deformidad ósea con fragilidad esquelética, se caracteriza por una desestructuración tanto de la arquitectura como del patrón laminar de la distribución de la colágena. Se observa un aumento del número de los osteoclastos y de los osteoblastos; además, la producción de la nueva matriz ósea, en esta enfermedad la velocidad de la resorción ósea es mayor en las zonas en donde hay un aumento del remodelado óseo, sin embargo, es estructuralmente menos sano que el hueso normal y puede arquearse o fracturarse fácilmente (13).

Las enfermedades del desarrollo del sistema óseo como el raquitismo o la osteomalacia son enfermedades dadas por la deficiencia o mal metabolismo de vitaminas, específicamente nos referimos a la vitamina D (14).

La deficiencia de la vitamina D se caracterizan por una mineralización dañada de la matriz ósea, cabe aclarar que en estado normal los cristales de hidroxapatita se forman en vesículas de matriz producidas por osteoblastos, de ión calcio y fosfato, sin embargo debido a las alteraciones causadas por la deficiencia de esta vitamina, puede haber presencia de hipofosfatemia o hipocalcemia, las cuales se piensa perjudican la mineralización al disminuir el calcio (4).

El incremento en la producción de la hormona paratiroidea conducen a una mayor remodelación ósea, reabsorción ósea y adelgazamiento cortical, que en conjunto produce una pérdida ósea cortical, huesos altamente propensos a fracturas y a deformaciones ante cargas aplicadas, (4).

Importancia de evaluar las propiedades biomecánicas óseas.

Como se ha podido observar, las características del hueso cambian constantemente, ya sea por el remodelado habitual o por la presencia de alguna enfermedad, afectando así a su composición mineral y por consiguiente a sus propiedades biomecánicas. El optimizar las técnicas de diagnóstico que se basan en establecer correlaciones entre las variables biomecánicas y las distintas variables que proporciona el análisis de la cantidad y la calidad ósea es importante (9).

Evaluar la importancia funcional de la rigidez, la carga máxima, el desplazamiento posterior al rendimiento y el trabajo a la fractura en el hueso, permitirá relacionar mejor los mecanismos genéticos y moleculares con los mecanismos biomecánicos que afectan la masa ósea y la resistencia a la fractura (8).

Equipos que se usan para evaluar las propiedades biomecánicas óseas

Para poder hacer una buena relación de los mecanismos genéticos y moleculares con los mecanismos biomecánicos (8), existen diferentes equipos cuya función es medir algunas de las propiedades biomecánicas del hueso, a continuación, mencionaremos algunos equipos y sus características.

Algunas de las técnicas utilizadas para el estudio de los huesos como: la radiología, la osteodensitometría, la tomografía computarizada (TC), la medición de biomarcadores, la absorciometría de rayos X de doble energía (DXA), la tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT) y la tomografía microcomputada (micro-CT), todos ellos son métodos sensibles para proporcionar una evaluación cuantitativa de la masa y la estructura ósea, sin olvidar que son pruebas que se hacen *in vivo*, no obstante, estas técnicas no explican el proceso celular, mecanismos a nivel de tejido que conducen a un desequilibrio de la masa ósea o microestructura alterada. Por otro lado, tenemos la histomorfometría que es una herramienta *ex vivo* esencial y sensible para evaluar la actividad celular y la mineralización en los diversos compartimentos óseos, sin embargo, tiene como limitante que no da información sobre las propiedades biomecánicas óseas como la flexibilidad o resistencia a la fractura (15).

Las pruebas de resistencia biomecánica óseas proporcionan una visión mecánica de los efectos de una carga aplicada en el hueso. Es por eso por lo que las pruebas biomecánicas son una evaluación esencial para la resistencia ósea, ya que se utilizan para predecir el potencial impacto en el riesgo de fractura (15)

Las pruebas de resistencia biomecánica para huesos largos como las pruebas de nanoindentación, sangría, flexión de 3 y 4 puntos, pruebas de torsión, cuello femoral (mediante cizallamiento) y para las vértebras (por compresión) se pueden realizar para evaluar los huesos si ningún tratamiento previo.

La nanoindentación mide el módulo de Young de muestras de pequeño volumen con la ayuda de una punta de diamante presionada en la superficie pulida de la muestra mientras se miden la fuerza aplicada y la profundidad de sangría (16).

Para las pruebas de sangría, se ha desarrollado un sistema llamado Osteoprobe, que es un microindentador de mano portátil y mide la capacidad del material óseo para resistir la sangría, mide la calidad del material óseo, también mide la capacidad del hueso para resistir una fuerza localizada, además puede calcular parámetros de pre-rendimiento como el módulo de elasticidad, así como parámetros de dureza, cabe agregar que a diferencia de todas las pruebas mencionadas, esta es la única prueba que se hace *in vivo*, sin embargo la capacidad de medición de este sistema, aún sigue en estudio y es costoso (17).

Por otro lado, las pruebas de torsión y flexión de cuatro puntos se utilizan con frecuencia para estudios de curación de fracturas, en las pruebas de compresión, una fuerza axial y vertical se aplica uniformemente en superficies paralelas de un espécimen de forma cilíndrica y una longitud de hasta dos veces su ancho, a diferencia de las pruebas de flexión, que son las pruebas más comunes y simples para los huesos largos. En este tipo de prueba, las extremidades de una muestra se colocan sobre dos soportes metálicos y se aplica una fuerza vertical progresiva en su centro a través de uno o dos puntos más.

En la flexión de cuatro puntos, las tensiones se distribuyen de manera más uniforme a lo largo de la muestra. Mientras que, con la prueba de corte del cuello femoral, se aplica la fuerza vertical en la parte superior de la cabeza femoral, la colocación del eje femoral verticalmente (es decir, en una postura de una sola pierna) se puede lograr con un accesorio especial o incrustando el aspecto distal de la muestra en un medio duro, las máquinas utilizadas para estos tipos de pruebas tienen dos partes alineadas verticalmente con una parte moviéndose a una velocidad elegida, aplicando una fuerza a un espécimen para el cual se registra el desplazamiento hasta que el hueso falla (15).

ANTECEDENTES

Estudiar las propiedades biomecánicas en tejido óseo en modelos animales puede mejorar el progreso de las pruebas preclínicas para la medicina traslacional destinada a reducir los riesgos de fractura ósea. La mayoría de los estudios usan la prueba de flexión de tres puntos debido a que es fácil de realizar y puede simular una aproximación para el cálculo de la resistencia a la fractura en diferentes condiciones fisiopatológicas del tejido óseo. Por lo tanto, es importante diseñar dispositivos capaces de evaluar las propiedades biomecánicas óseas para usar esta herramienta de elementos finitos, ya que es una técnica segura, reproducible y que da información invaluable para la salud ósea.

Cabe recordar que las propiedades mecánicas del hueso están determinadas por su composición y estructura, e influenciadas por las cargas que soporta a través de la adaptación y remodelación

Diversos estudios que evalúan las propiedades biomecánicas óseas se han desarrollado a lo largo de todo este tiempo, siendo así que esta clase de estudios han sido un gran apoyo para la evaluación de algunas características del hueso en condiciones patológicas.

Un ejemplo de esto es el un estudio realizado por Brent J. F. Hill et al. (2008) (18), quienes evaluaron cómo la deficiencia del estrógeno gonadal afectaba las propiedades biomecánicas óseas, para determinar esto utilizaron el ensayo de flexión de tres puntos, en las tibias de ratones C57BL/6 ovariectomizados y controles. Observaron que los ratones ovariectomizados presentaron pérdida de los niveles de estrógeno en plasma y las tibias de estos ratones tuvieron un menor punto de fractura, carga máxima y rigidez que las tibias de los ratones control. Concluyeron que la pérdida de estrógeno gonadal disminuye la resistencia ósea debido al incremento en la actividad osteoclastogénica (18).

Estos autores ponen en evidencia la importancia del uso del ensayo de flexión de tres puntos para la medición de las propiedades biomecánicas óseas en modelos animales con osteopatías.

Se ha mostrado que para el estudio de las propiedades óseas es necesario el uso de instrumentos capaces de registrar como afectan las cargas externas al hueso en distintas condiciones, los experimentos realizados por algunos autores han demostrado que el uso de pruebas de flexión de tres puntos, flexión de cuatro puntos, flexión cantilever, compresión axial, torsión restringida y torsión no restringida son las más adecuadas para evaluar las propiedades biomecánicas del hueso (19). Sin embargo, a pesar de ser pruebas aptas para el estudio de las propiedades biomecánicas óseas, no todas poseen las mismas ventajas y desventajas por lo que aún se debate cuál de ellos es más sensible a las condiciones experimentales.

Los resultados de la comparación de cada uno de estos sistemas para la medición de las propiedades biomecánicas óseas, demostraron que la prueba de flexión de tres puntos es más fácil de aplicar, además de dar resultados más precisos y reproducibles. Se determinó que las pruebas de compresión axial son muy sensibles a las variaciones inter-animal, por lo tanto, no se pueden

recomendar. Al comparar las pruebas de torsión sin restricciones y torsión restringida, se observó que la prueba de torsión sin restricciones es experimentalmente más difícil de realizar que las pruebas de torsión restringida, ya que muestran ser independiente de la alineación rotacional. Así mismo las pruebas de torsión restringida mostraron pequeños errores debido a un desplazamiento entre el eje de gravedad de las muestras y el eje de rotación torsional (20).

Estudios recientes sobre las propiedades del hueso se han centrado en comprender el origen de la tenacidad ósea y su resistencia, para ello la prueba que se utiliza con más frecuencia es la prueba de flexión de tres puntos y esto es debido a que con ella se puede hacer una representación de la flexión que puede tener un hueso en movimiento, así como la evaluación del riesgo de fractura del mismo, dada la limitación asociada con las herramientas actuales de evaluación del riesgo de fractura clínica, resalta la necesidad de una mayor comprensión de los mecanismos de fractura del hueso, siendo así que la mayoría de los investigadores han utilizado la prueba de flexión de tres puntos ya que era fácil de realizar y proporciona un cálculo de la resistencia a la fractura (20).

Debido a esto, la flexión de tres puntos es más fácil de aplicar bajo condiciones de prueba realistas y proporciona mediciones precisas, siempre que haya una baja variación de la forma del hueso entre las muestras analizadas (19).

Ya que el propósito de la prueba de flexión de tres puntos es evaluar las propiedades biomecánicas del hueso, entre ellas resistencia a la fractura, se han desarrollado diversos estudios en modelos *ex vivo*, sin embargo, existen algunos estudios en donde se han realizado pruebas *in vivo*.

T. Koy et al. (2014) (21), realizaron la evaluación de la resistencia ósea en tibias de humanas, para ello, se hicieron modificaciones al procedimiento, se colocaron tornillos en la porción ventral de la tibia, con una separación de 10 cm, posteriormente se realizó la prueba de flexión de tres puntos con 10 y 20 kg de peso colocados de la misma forma que los soportes universales de las pruebas de flexión de tres puntos, el ángulo de flexión causado por el peso aplicado se calculó a partir del desplazamiento de marcadores en el fémur (21). Los resultados obtenidos en esta prueba muestran que una prueba de flexión de tres puntos en humanos es factible siempre y cuando se tenga en cuenta todos los factores de riesgo que conlleva la intervención quirúrgica

JUSTIFICACIÓN

Los elementos que componen al hueso le otorgan propiedades biomecánicas específicas, que se pueden ver afectadas en osteopatías. Aún hoy, todavía no se comprende completamente cómo los estados de enfermedad específicos pueden afectar la biomecánica ósea, así como la aplicación de ciertas terapias pueden mejorar la resistencia del hueso para reducir el riesgo de fractura. Más aún, la falta de modelos y dispositivos de flexión de tres puntos de bajo costo, que no requieran de personal especializado y que permitan la obtención de los valores de las propiedades de forma automatizada, dificultan el estudio de las patologías óseas y el efecto de las terapias en sus propiedades biomecánicas. La evaluación precisa de la calidad ósea podría potencialmente predecir el riesgo de fractura ósea. Por lo que es importante el desarrollo de un dispositivo que posea la capacidad de medir las propiedades biomecánicas del hueso, que no requiera manejo por personal especializado, ni un gran espacio para su instalación, que sea de bajo costo y nos ayude a obtener valores fidedignos y automatizados de las propiedades biomecánicas óseas.

HIPÓTESIS

Se puede realizar la confección de un sistema de flexión de tres puntos con la capacidad de medir las propiedades biomecánicas en huesos sanos versus huesos descalcificados o deshidratados y huesos sanos versus huesos con osteoporosis de bajo costo, con la adaptación de un sistema Arduino y el desarrollo de un script en Matlab para facilitar el registro de los valores obtenidos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y calibrar un dispositivo de flexión de tres puntos para medir y determinar las propiedades biomecánicas del hueso.

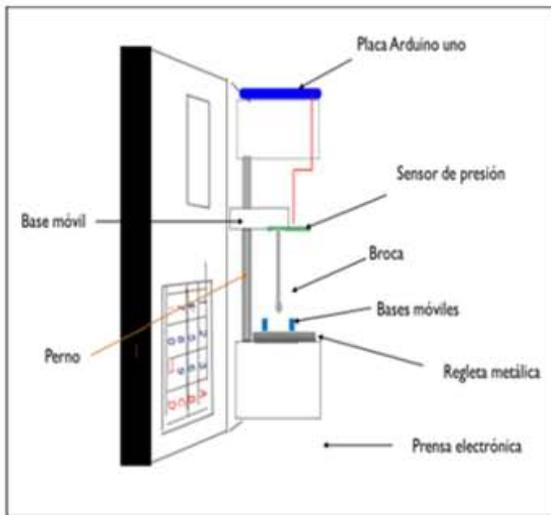
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar una prensa eléctrica a un sensor de presión y una broca de acero inoxidable.
- Desarrollar mediante un microcontrolador de Arduino y el programa de laboratorio de matrices matemáticas (Matlab) un sistema de adquisición de datos y un programa “script” que posea las cualidades para poder registrar los datos obtenidos por el sensor de presión.
- Medir las propiedades biomecánicas: elasticidad, plasticidad, rigidez, módulo de elasticidad, carga máxima y la fuerza de fractura en fémures y tibias de ratones BALB/C y C57BL/6 deshidratados, descalcificados, sanos o ratones con osteoporosis, así como de réplicas óseas confeccionadas con materiales de uso odontológico (resinas fotocurables y fluidas, acrílico dental y yeso tipo III).

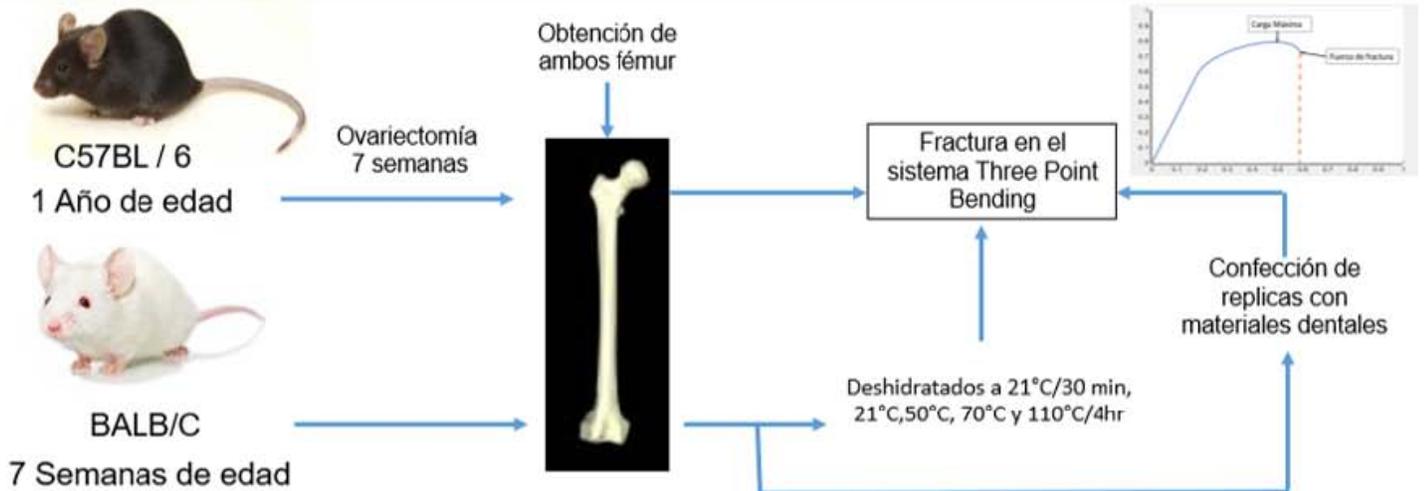
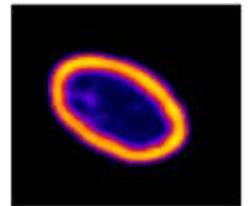
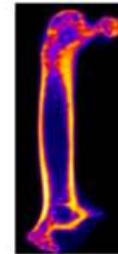
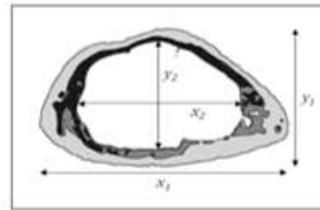
MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder cumplir los objetivos previamente planteados, se ha desarrollado una estrategia experimental que a continuación será descrita.

Estrategia experimental.



Esfuerzo (σ)	$\sigma = PL^3/848I$
Deformación (ϵ)	$\epsilon = \delta (12C/L^2)$
Módulo de elasticidad (E)	$E = PL^3/48I$
Momento de inercia (I)	$I = \pi/64[(X_1 Y_1^3) - (X_2 Y_2^3)]$



Desarrollo de sistema de flexión de tres puntos

En colaboración con el Dr. David Elías del área de bioelectrónica del de CINVESTAV se desarrolló de una prensa electrónica, a esta prensa se le agrego un pequeño motor el cual provoca el movimiento vertical de una placa a través de un perno, y por medio de este se acercará o alejará a una placa base que permanece fija. (figura 1.) Este sistema puede ser manipulado de forma manual o automática (bluetooth), sin embargo, se recomienda el uso automático ya que es más fácil de controlar y permite mantener una velocidad y fuerza constante.

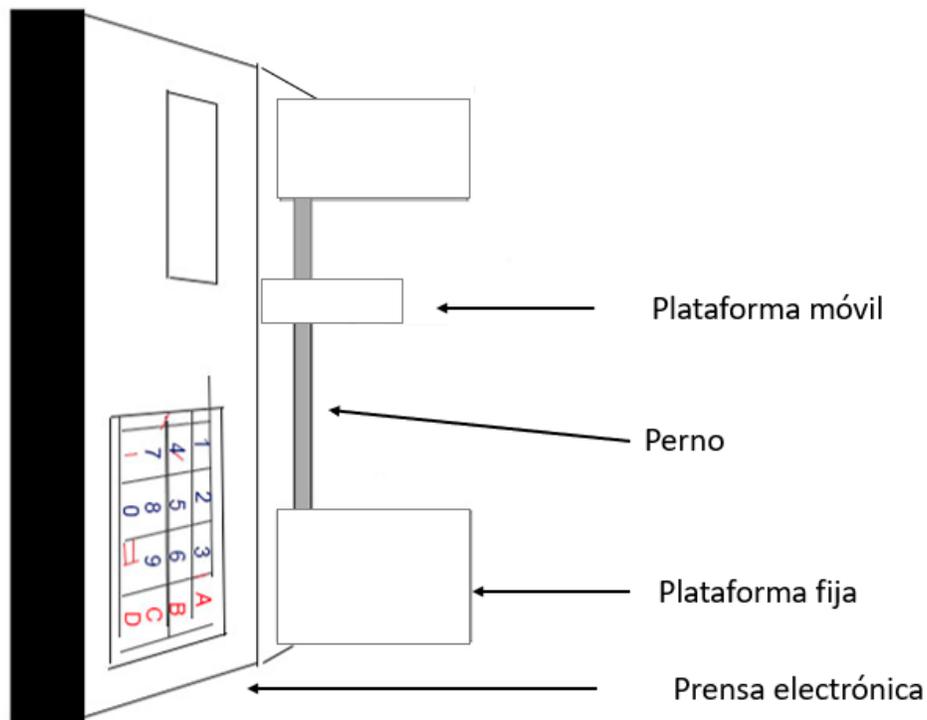


Fig. 1. Representación de la prensa electrónica. Se muestra una representación del diseño de una prensa electrónica, en donde se señalan las partes que la conforman. **Elaboración propia.**

Posteriormente y una vez calibrada la prensa eléctrica, se adaptó una broca de acero inoxidable en forma de "T" invertida (figura 2), esto con el propósito de lograr una fractura en una sola intención, esta broca fue adaptada por medio de una masilla de acrílico la cual fue colocada de forma estratégica en la placa móvil de la prensa, esto con el propósito de fijarla para que no se caiga u oscile , permitiéndole solamente movimiento de arriba hacia abajo, sin embargo entre el soporte de la broca y el vástago, se colocó un tope para evitar que la broca caiga por completo.

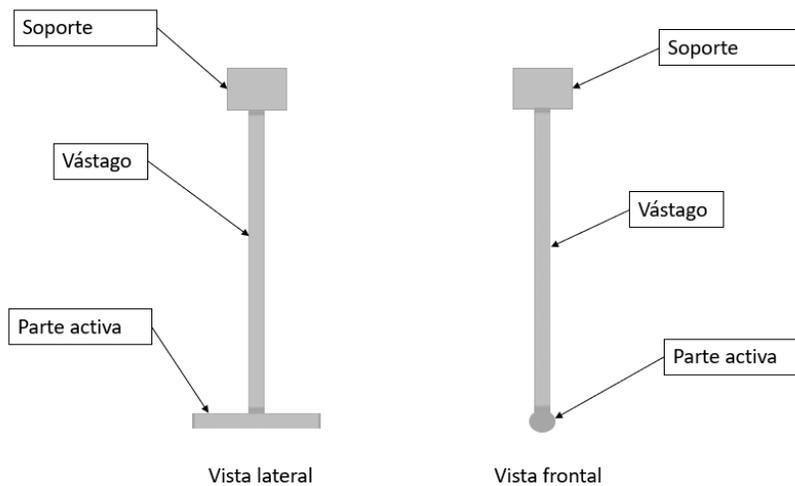


Fig. 2. Partes de la broca. Se muestran las partes de la broca, de lado izquierdo se puede apreciar una vista lateral de la broca, mientras que de lado derecho se puede apreciar la vista frontal de la broca, como se puede notar la parte activa es un cilindro, esto con el propósito de tener una punta roma que cause una fractura en una sola intención. **Elaboración propia.**

Posteriormente se procedió confeccionar la base para colocar los huesos, la cual fue confeccionada utilizando la regleta de un vernier metálico, al cual se le adaptaron dos soportes móviles de acrílico, las cuales se puede mover a lo largo de la regleta para ajustar su distancia, estos soportes en su parte superior se les fue colocados un cilindro metálico idéntico a la parte activa de la broca, el cual tiene como función el soportar los huesos al momento de hacer las pruebas de flexión. Finalmente se procedió a adaptar el sensor de fuerza (MF01-N-221-A01 autoadherible marca ALPHA), el cual fue colocado entre la placa móvil, y el soporte de la broca, este sensor se adaptó por medio de cables puente, los cuales fueron soldados al sensor y posteriormente se conectaron a la placa Arduino. (figura 3)

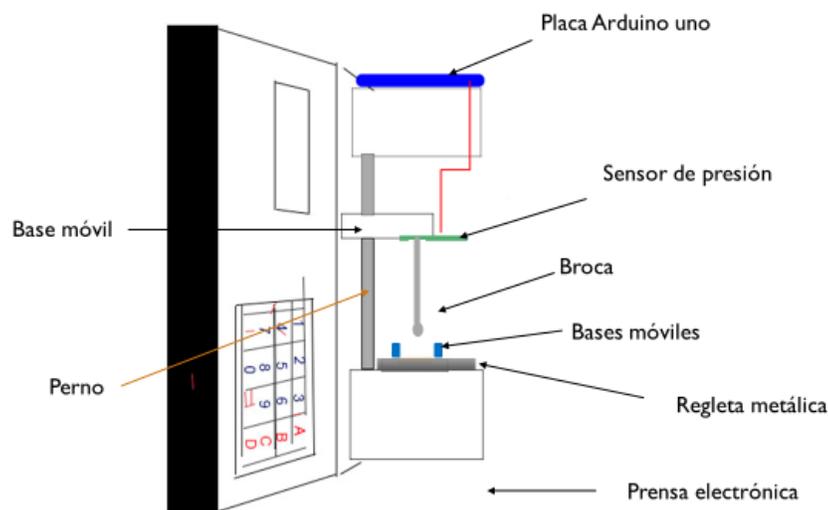


Fig.3. Adaptación de prensa eléctrica. Se muestra el diseño de la prensa eléctrica, así como los aditamentos que se le agregaron para crear un sistema de flexión de tres puntos. **Elaboración propia.**

El sensor de fuerza MF01-N-221-A01 autoadherible marca ALPHA, cuenta con las siguientes características:

CARACTERISTICAS DEL SENSOR DE FUERZA MF01-N-221-A01	
Fuerza de actuación	30g min.
Rango de sensibilidad	30 a 10,000g.
Repetitividad	5%.
Resistencia sin carga	20 MOhms.
Histéresis	10%.
Tiempo de respuesta	<1ms.
Rango de temperatura	-30°C a 70°C.
Ancho	0.05 mm.
Rendimiento	100 KΩ (presión ligera) a 200Ω (máx. presión)
Gama Fuerza	0 a 20 libras (0 a 100 Newtons)

Tabla 1. Características del sensor de fuerza MF01-N-221-A01 autoadherible. Tabla descriptiva de las características del sensor (22).

Calibración de la fuerza del sensor

El sensor de presión fue calibrado por medio del uso de pesas con diferentes tipos de gramaje, dado que la capacidad del sensor va de 0 a 100N N se realizó una conversión de Newtons a kilogramos (1kg/f corresponde a 9.8N) La calibración nos permitió corroborar que los valores obtenidos se registran correctamente por el sensor de presión y lo indicado en la interfaz. Se calibró con 500g, 1kg y 10kg.

Programación de Arduino y Script en Matlab

Para poder procesar las señales enviadas por el sensor y obtener valores numéricos, se ha recurrido al uso de una placa Arduino Mega 2560 (tabla 2), esta placa se programó por medio del software Arduino IO, este software le permite a nuestra placa la obtención de las señales enviadas por el sensor (señales análogas) y las convierte en señales digitales que posteriormente serán enviadas a la computadora para ser transformadas en señales numéricas por medio del programa Matlab.

CARACTERISTICAS ARDUINO MEGA 2560	
Microcontrolador	ATmega2560
Tensión de funcionamiento	5V
Voltaje de entrada (recomendado)	7-12V
Voltaje de entrada (límite)	6-20V
Pernos digitales de E / S	54 (de los cuales 15 proporcionan salida PWM)
Clavijas de entrada analógica	dieciséis
Corriente DC por Pin de E / S	20 mA
Corriente DC para 3.3V Pin	50 mA
Memoria flash	256 KB de los cuales 8 KB utilizados por el gestor de arranque
SRAM	8 KB
EEPROM	4 KB
Velocidad de reloj	16 MHz
LED_BUILTIN	13
Longitud	101.52 mm
Anchura	53.3 mm
Peso	37 gr

Tabla 2. Características de Arduino Mega 2560. Se muestra una tabla con las especificaciones de la placa Arduino (23).

Una vez que se hizo la programación de la placa Arduino, se procedió a la creación del script que permitiría obtener de forma numérica los datos registrados por el sensor, es así que por medio de la paquetería de Matlab y gracias a la colaboración de los alumnos pertenecientes a este mismo laboratorio, pero de la sección de Neurobiología, se desarrolló una interfaz la cual registra de forma numérica los datos que arroja el sensor en una hoja de cálculo, estos datos posteriormente son analizados por medio de esta interfaz la cual tiene la capacidad de calcular las propiedades biomecánicas de los huesos mediante la aplicación de la aplicación de fórmulas específicas. (tabla 3)

Esfuerzo (σ)	$\sigma = PL^3 / \delta 48I$
Deformación (ϵ)	$\epsilon = \delta (12C / L^2)$
Módulo de elasticidad (E)	$E = PL^3 / 48I$
Momento de inercia (I)	$I = \pi / 64 [(X_1 Y_1^3) - (X_2 Y_2^3)]$

Tabla 3. Fórmulas para el cálculo de propiedades biomecánicas. Las fórmulas mostradas aquí, se utilizaron para el cálculo de las propiedades biomecánicas, en donde donde P representa la carga aplica, L es la distancia de los soportes, C es la mitad del diámetro externo menor de la sección transversal del hueso en el punto de aplicación de la fuerza, I es el momento de inercia y δ es el desplazamiento (24).

Para obtener el valor de la inercia, se requieren las medidas de la sección ósea de la cual se quiere obtener las propiedades. (figura 4)

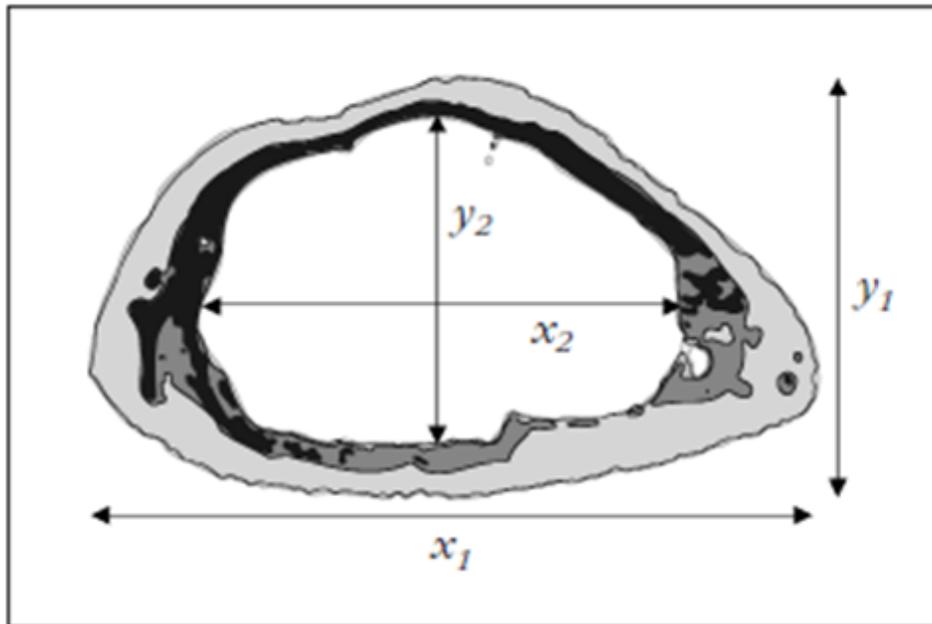


Fig. 4. Representación de los ejes para obtener la inercia. Se muestran los ejes de los cuales se obtendrán los valores de la inercia, donde X_1 es el diámetro externo mayor de la sección transversal en el punto de aplicación de la fuerza, Y_1 es el diámetro externo menor, X_2 es el diámetro interno mayor e Y_2 el diámetro interno menor. **Figura modificada de Caeiro JR.** (24)

Para poder obtener las medidas necesarias para el cálculo de la inercia, el departamento de física de la UNAM nos proporcionó imágenes tridimensionales de un fémur y una tibia de ratón obtenidas por medio de micro CT, que por medio de programa Bone J (25) se obtuvieron las medidas del área a calcular sus propiedades. Una vez seleccionada la sección a trabajar, se tomó un punto de referencia, a partir del cual se recolectaron los valores para los ejes (X_1, X_2, Y_1, Y_2) de 20 imágenes por delante del punto de referencia y 20 imágenes antes de nuestro punto de referencia, de los cuales al final se obtuvo un promedio, el cual fue el valor que se utilizó para representar cada uno de los ejes del hueso. (figura 5)

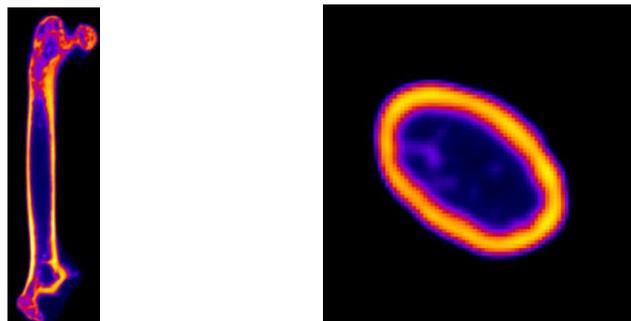


Fig 5. Imágenes obtenidas por microtomografía computarizada. Imágenes representativas de un hueso analizado por medio de micro CT. **Departamento de física UNAM**

Animales

Se adquirieron ratones C57BL / 6 de 18 semanas de edad y de 1 año de edad, además de ratones BALB/C de 7 semanas de edad del bioterio de Iztacala UNAM. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h, se mantuvieron a temperatura ambiente y se les dio alimento (Tekland 8640 dieta de roedores; Envigo) y agua *ad libitum*.

Proceso de deshidratación

Se incluyeron 3 fémures o 3 tibias en uno de los siguientes grupos:

- * Control (sin deshidratación)
- * Deshidratado a temperatura ambiente por 30 minutos (21 °C)
- * Deshidratado en horno de secado por 4 horas a 21 °C
- * Deshidratado en horno de secado por 4 horas a 50 °C
- * Deshidratado en horno de secado por 4 horas a 70 °C
- * Deshidratado en horno de secado por 4 horas a 110 °C

La temperatura más alta se eligió por estar debajo de la temperatura a la que el calor induce la desnaturalización del colágeno (160 °C) (26).

Finalmente, las muestras se almacenaron en una gasa empapada con solución salina tamponada con fosfato a -20 °C antes de las mediciones

Después de descongelarse, cada hueso se limpió sin agua superficial, se pesó en aire con una balanza electrónica y pesado nuevamente mientras se sumergía en agua. Luego las muestras se deshidrataron en un horno (Luzeren). Antes de las pruebas mecánicas se aseguró que la masa de los huesos no cambiase en más de 0.03% mientras se pesaba en agua (27).

La pérdida de agua se calculó como la diferencia entre el peso de la muestra de hueso antes del secado con el peso obtenido después del secado.

Inducción de osteoporosis por deficiencia de hormonas

Cuando los ratones C57BL/6 tenían 7 semanas de edad se les realizó una ovariectomía dorsal estándar (OVX) o cirugía simulada (SHAM). Para la cirugía, los ratones fueron anestesiados con una dosis de ketamina (40-90mg/kg) con xilacina (5-15mg/kg). Los ratones se sacrificaron a las 6 semanas después de la cirugía usando sobredosis de éter. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la FES Iztacala UNAM CE/FESI/082017/1159.

Después de la eutanasia los fémures y las tibias se diseccionaron de las extremidades inferiores de los ratones, se limpiaron de cualquier tejido blando y se almacenaron a -20 ° C hasta la experimentación.

Elaboración de réplicas óseas con materiales dentales

Con el objetivo de determinar la utilidad del equipo construido no solo para muestras biológicas, también para otros materiales, se realizaron réplicas de los fémur y tibias de diferentes materiales de uso odontológico para medir las propiedades mecánicas. Se siguió la norma ISO-Comité TC106-Odontología para el grosor adecuado y construcción de especímenes muestra para medir las propiedades físicas y mecánicas de resina fotocurable, resina fluida, acrílico y yeso (28).

Las réplicas realizadas con diversos materiales de uso dental se obtuvieron mediante la toma de impresión de los huesos obtenidos de los ratones sanos de 8 semanas de edad. Para la impresión se utilizó alginato (Alginato Tipo 1 de Toma Rápida de Kulzer), con la impresión se obtuvieron los moldes de tibias y fémur, (utilizando una $n=3$) para cada material, inmediatamente después se recuperaron los huesos y fueron colocados en una solución amortiguadora de fosfato (PBS) para evitar su deshidratación, cabe destacar que, una vez utilizada la impresión para hacer el vaciado con algún material específico, la impresión con alginato no puede ser utilizada nuevamente debido a que sufre de una ligera contracción causada por la pérdida de agua, lo cual causaría una variación considerable en el tamaño de las réplicas, sabiendo eso, nosotros consideramos necesario tomar impresiones para cada material utilizado.

Muestras de Resina fotocurable

Posteriormente e inmediatamente después de colocar las muestras en PBS se procedió a confeccionar las réplicas, esto se realizó mediante un vaciado con resina fotocurable (Tetric EvoCeram Bulk Fill de Ivoclar Vivadent) sobre la huella que dejaron los huesos sobre el alginato, la resina se fue colocando por estratos, cada estrato fue fotocurado con una lámpara marca DTELed, por un tiempo de 45 segundos a una potencia de 1200 mW/cm^2 con una longitud de onda de $480\text{-}490\text{nm}$, una vez polimerizadas las muestras, se retiraron del molde y se fotocuró por completo cada muestra. Se confeccionaron 3 réplicas para tibias y tres para fémures. El grosor de las réplicas fue adecuado según la norma ISO-Comité TC106-Odontología.

Muestras de Resina fluida

Para la confección de las muestras de resina fluida se utilizó resina fluida medental A2, se procedió a vaciar la resina sobre el molde hasta llenarlo por completo, posteriormente se fotocuró por un tiempo de 45 segundos con una lámpara marca DTELed de 1200 mW/cm^2 con una longitud de onda de $480\text{-}490\text{nm}$, procurando que la luz ultravioleta abarcara todos los espacios, posteriormente la muestra se extrajo del molde y se volvió a fotocurar 45 segundos más con la misma potencia. Se confeccionaron 3 réplicas para tibias y tres para fémures. El grosor de las réplicas fue adecuado según la norma ISO-Comité TC106-Odontología.

Muestras de Acrílico

Las muestras confeccionadas a base de acrílico se realizaron con acrílico Nic Tone autocurable, la prelación de acrílico fue en proporciones de 2:1 (dos gotas de monómero por una medida de acrílico (se utilizó una cucharilla para abastecimiento de cemento dental), la consistencia para realizar el vaciado fue fluida, esto con el fin de que el acrílico pudiera llenar todo el molde sin problemas, finalmente las muestras se retiraron de los moldes para posteriormente retirar los remanentes dejados por el acrílico por medio de un micromotor y una piedra rosa. Se confeccionaron 3 réplicas para tibias y tres para fémures. El grosor de las réplicas fue adecuado según la norma ISO-Comité TC106-Odontología.

Muestras de Yeso

Finalmente, las réplicas en yeso fueron confeccionadas con yeso de uso dental (Nic Tone Yeso velmix tipo III), la consistencia en la que se trabajó el yeso fue una consistencia en forma de pasta, lo cual evita que queden vacíos y por consecuente afecte las condiciones de la muestra, el vaciado del yeso se fue haciendo por secciones y por cada porción de yeso agregada, se daban pequeños golpes al contenedor donde estaba la impresión, esto con el fin de lograr que el yeso se distribuya bien. Una vez llenado el molde, se procedió a colocar un recipiente sobre la muestra para de esa forma conservar el calor y así favorecer el secado del yeso, finalmente se procedió a extraer las muestras con sumo cuidado ya que son muestras frágiles. Finalmente, todas las muestras fueron colocadas en frascos para evitar su ruptura. Se confeccionaron 3 réplicas para tibias y tres para fémures. El grosor de las réplicas fue adecuado según la norma ISO-Comité TC106-Odontología.

Medición de las propiedades biomecánicas en tejido óseo y en materiales dentales

El aparato de flexión de tres puntos modificado utilizado en este estudio se utilizó de la siguiente forma: Antes de la experimentación, los huesos se empaparon en una solución tampón de fosfato durante 24 h. La tibia y fémur se colocó en un soporte que fijaba los extremos del hueso en su lugar mientras se medía (6mm de distancia entre los soportes para el fémur y 8mm de distancia entre los soportes para la tibia). La cantidad de fuerza se aplicó perpendicular al punto medio del lado anterior hueso. La fuerza se aplicó a una velocidad de 0.039 mm/s y un momento de inercia de 0.18204754 para el fémur y de 0.0510187 para la tibia (29).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm S. E. para el número de huesos utilizados (n=3). Los datos fueron analizados utilizando un análisis de ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey. Se considero significativo con un $p \leq 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Grapad prism 9.

RESULTADOS

Construcción del sistema de flexión de tres puntos.

Se usó una prensa eléctrica elaborada en el departamento de bioelectrónica en el IPN-CINVESTAV bajo la dirección del Dr. David Elías como base para el diseño del equipo de flexión de tres puntos (figura 6A). Se colocó un sensor en la base de la placa móvil de la prensa y frente a este la base de un vástago de metal con punta roma que será la que impacte con la muestra biológica (figura 6B, a).

Se adoptó una base semiajustable para la colocación de la muestra biológica. La base cuenta con una regleta en milímetros (figura 6b) para hacer posible la selección de la distancia entre las bases de la muestra biológica (figura 6c). Esto permite que la fuerza aplicada por el vástago se distribuya de forma uniforme a ambos lados del hueso y que la resistencia que se mida sea el reflejo de la fragilidad ósea.

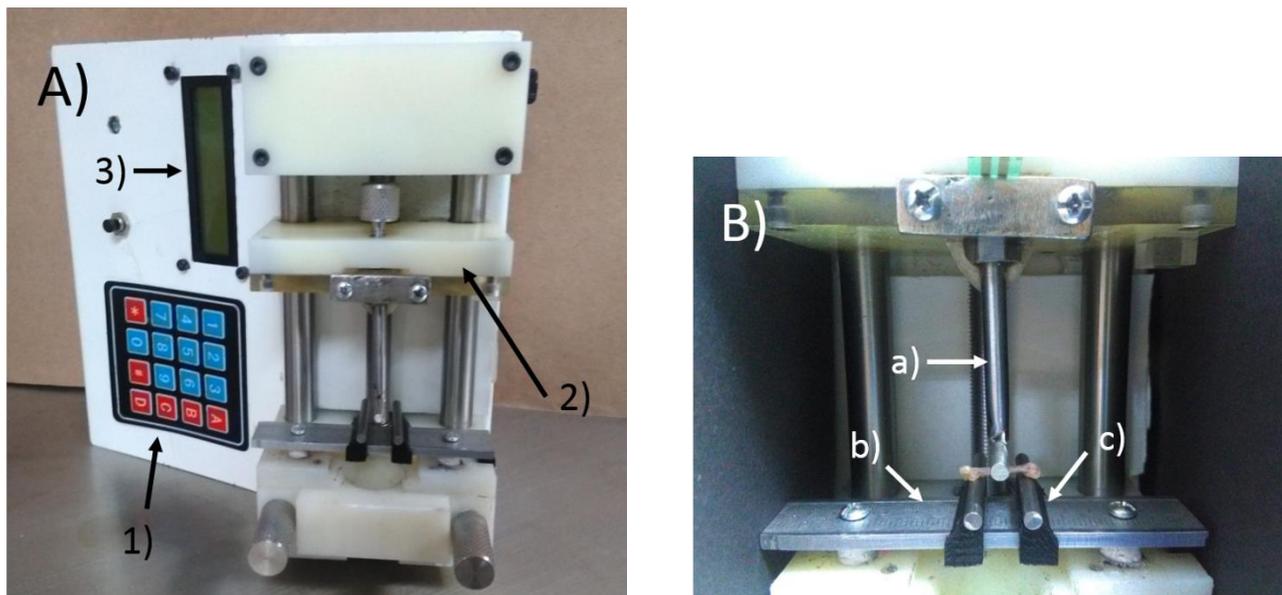


Fig. 6. Diseño del sistema de flexión de tres puntos. A) vista completa. Se muestra la prensa electrónica sin los aditamentos, 1) Controlador manual, 2) Placa móvil, 3) Pantalla. **B) Acercamiento de la parte activa.** Se muestra la parte del dispositivo encargada de llevar a cabo la prueba de flexión de tres puntos. a) Broca, b) Regleta, c) Bases para soporte de muestras. **Elaboración propia**

La prensa cuenta con dos formas de manipularlo de forma electrónica, una forma manual y una por medio de bluetooth, lo cual permite al operador decidir la forma de uso del sistema, sin embargo el uso del sistema de forma manual, resulta ser poco práctico e inestable por el manejo manual de la velocidad y distancia recorrida, por lo que se recomienda el uso automático (por medio de bluetooth) en donde previamente se programa la velocidad y distancia que se quiere que recorra. Una vez conectada la prensa a un dispositivo electrónico via bluetooth, se despliega una aplicación que

permite seleccionar la velocidad de avance de la prensa, así como el tiempo en que se realice la acción, además de las veces que queremos que la acción se repita (figura 7).

También, ofrece la opción de retroceso una vez que la broca haya realizado la fractura. Además de eso se han determinado los valores aproximados que deben ingresarse en la app, definiendo así que en el apartado donde se ingresa el volumen, se da la indicación de 0.6 mm (que refleja el avance del vástago), en una sola repetición y a 1mm x segundo (que da como resultado una velocidad del vástago de 0.039 mm/s).



Fig. 7. Controlador automático. Aplicación permite controlar el sistema de flexión por medio de conexión bluetooth a un dispositivo electrónico. **Elaboración propia.**

Desarrollo de interfaz en Matlab y resultado del proceso de la interfaz.

Para llevar a cabo el análisis de las pruebas biomecánicas, en colaboración con el laboratorio de neurobiología de las sensaciones orofaciales de la FES Iztacala UNAM, se desarrolló una interfaz con las capacidades de registrar las propiedades óseas por medio de la programación de una placa Arduino y un script de Matlab.

El sensor de presión adaptado a la placa Arduino registra la fuerza en Newtons (N) que se aplica sobre el sensor, resultado de la presión del vástago sobre el fémur y se registra la distancia recorrida. En la figura 8 se observa la representación gráfica de lo anterior.

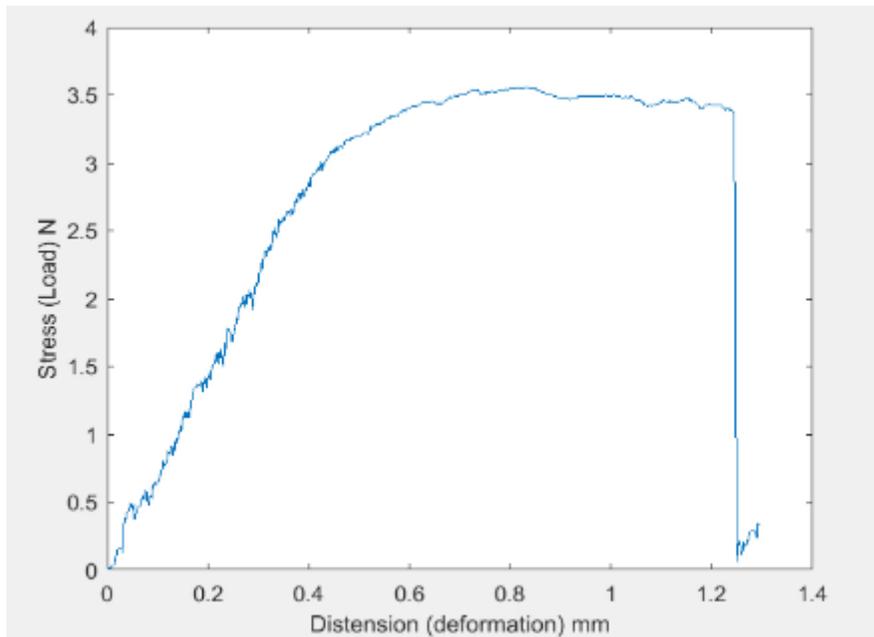


Fig. 8. Ejemplo de gráfico fuerza vs distancia recorrida. Se muestra un gráfico en donde en el eje de las “Y” se registran los valores obtenidos para la fuerza y en el eje de “X” se grafica la distancia recorrida por la broca.

A partir de los valores gráficos de X y Y, donde X, es el desplazamiento (mm) y la deformación (mm) y Y la fuerza (N) y el esfuerzo (δ), podemos obtener valores cuantitativos como carga máxima, punto de fractura, limite elástico, además de valores cualitativos como la elasticidad y la plasticidad (figura 9A y B).

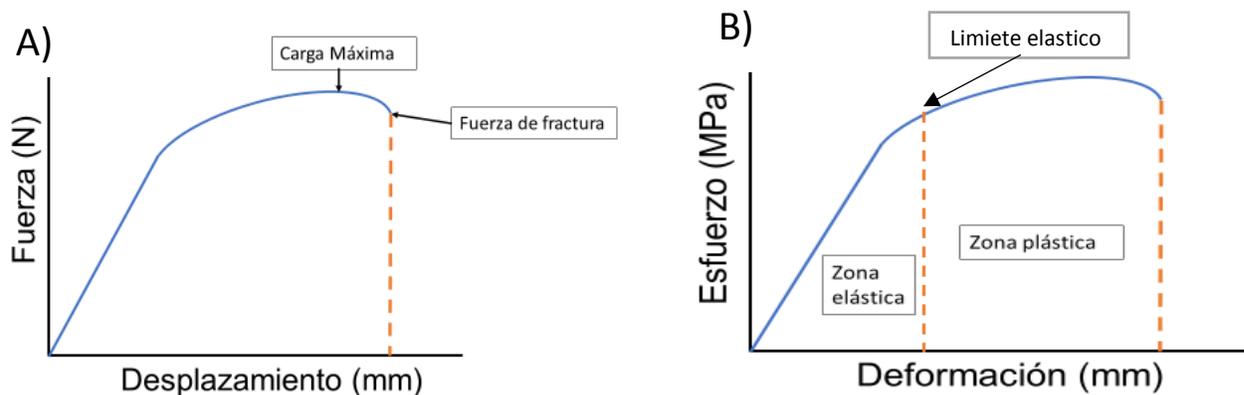


Fig. 9. Graficas representativas de las propiedades biomecánicas. A) Fuerza -desplazamiento. En esta gráfica, se registran los valores obtenidos para la carga máxima y fuerza de fractura. **B) Esfuerzo – Deformación.** Grafica donde se registran los valores obtenidos para el limite elástico y la resistencia que está dada por la suma de las regiones elástica y plástica.

Dentro de la programación que nos entregaron por el laboratorio de neurobiología de la FES Iztacala, se pueden distinguir los comandos utilizados para la elaboración del Script en Matlab que tienen la función de detectar el valor requerido para la obtención de cierta propiedad biomecánica (figura 10).

En los primeros 4 renglones, se encuentran las fórmulas utilizadas para encontrar el punto de inflexión o límite elástico. En la línea 5 se encuentra la fórmula que permite localizar el punto de fractura respecto al eje de las Y. De la línea 6 a la 11, se encuentran las fórmulas que permiten localizar la pendiente de la recta, la cual va a estar dada por las coordenadas (0,0) y el punto de inflexión. De la línea 12 a la 19, se encuentran los comandos que permiten encontrar el valor mayor a la pendiente obtenida en el eje de las Y, ya que estos valores permiten crear un parámetro para localizar el punto de inflexión. En la línea 21 se encuentra la fórmula que determina el valor definitivo de inflexión o límite elástico, utilizando los valores de la pendiente obtenidos y adelantándolos un 0.02% con respecto al eje de las X. En la línea 22 se encuentra el comando que registra el valor máximo de carga obtenido durante la prueba, el cual indica la fuerza máxima. En la línea 23 tenemos el comando que indica el desplazamiento que hay desde el punto de inflexión hasta el punto de fractura, con esta fórmula se puede determinar la plasticidad de la muestra. Finalmente, de la línea 24 a 26 tenemos los comandos utilizados para la obtención numérica de los valores para la elasticidad, límite elástico y deformación máxima respectivamente.

```

1 er=find(Esfuerzo23)<yieldyy; ← Busca los valores menores al punto de inflexión
2 Esfuerzo23(:,er)=[]; ← Elimina los valores menores al punto de inflexión
3 err=length(Esfuerzo23) ← Busca la posición del último valor registrado mayor al punto de inflexión
4 broken=Esfuerzo23(:,err); ← Localiza el valor de el punto de fractura con respecto a las líneas de arriba
5 stiffness=((newtons-0)/(mm-0)); ← Localiza el punto de fractura
6 for cu=1:length(pN)
7     ci=cu+foor;
8     y2=pN(maxxx(1,1)-cu,:);
9     x2=alfa(maxxx(1,1)-cu,:);
10    y1=pN(maxxx(1,1)-ci,:);
11    x1=alfa(maxxx(1,1)-ci,:);
12        formada por las coordenadas (0,0) y el valor máximo
13    pendienteji=((y2-y1)/(x2-x1));
14    if pendienteji>pendientebase
15        yieldyy=pN(maxxx(1,1)-cu,:);
16        yieldxx=alfa(maxxx(1,1)-cu,:);
17        break
19    end
20 end
21 yield=newtons; ← Determina el valor del punto de inflexión avanzando del punto encontrado anteriormente +2% en el eje de las x
22 maximo=max(pN); ← Determina el valor máximo de fuerza registrado por el equipo
23 des=maxx-errt2; ← Determina el desplazamiento que hay desde el punto de inflexión hasta el punto de fractura
24 elastic=((stiffness*Ldistancia^3)/(48*Imomento); ← Formula de elasticidad
25 ystress=(newtons*Ldistancia*Cdiafisis)/(4*Imomento); ← Formula del estrés de rendimiento
26 Deformacionmax=mm*((12*Cdiafisis)/(Ldistancia*Ldistancia)); ← Formula de deformación máxima

```

Obtiene la pendiente de la recta formada por las coordenadas (0,0) y el punto de inflexión (mm, newtons)

Busca el valor donde la pendiente formada entre los valores de Newtons que sea mayor a la pendiente

Fig. 10. Script utilizado para el análisis de las propiedades mecánicas óseas. Script elaborado en Matlab, que proporciona los datos e indicaciones para controlar la interfaz. **Derechos reservados Laboratorio de neurobiología de las sensaciones orales.**

Posteriormente, también en colaboración con el laboratorio de neurobiología de las sensaciones orales, se diseñó una interfaz en Matlab que pudiera desplegar la gráfica y los valores obtenidos en la aplicación de las ecuaciones y los análisis. Con las fórmulas previamente desarrolladas, la interfaz permite el registro de los valores obtenidos durante la prueba y obteniendo en primera instancia, una imagen (gráfica) y un documento de Excel en el que se guardan todos los valores obtenidos, este documento puede ser cargado nuevamente a la interfaz si lo que se desea es hacer el análisis completo de la muestra, es así que con la interfaz se puede hacer los análisis al momento o después de obtener todos los registros, sin necesidad de aplicar más fórmulas o hacer cálculos independientes.

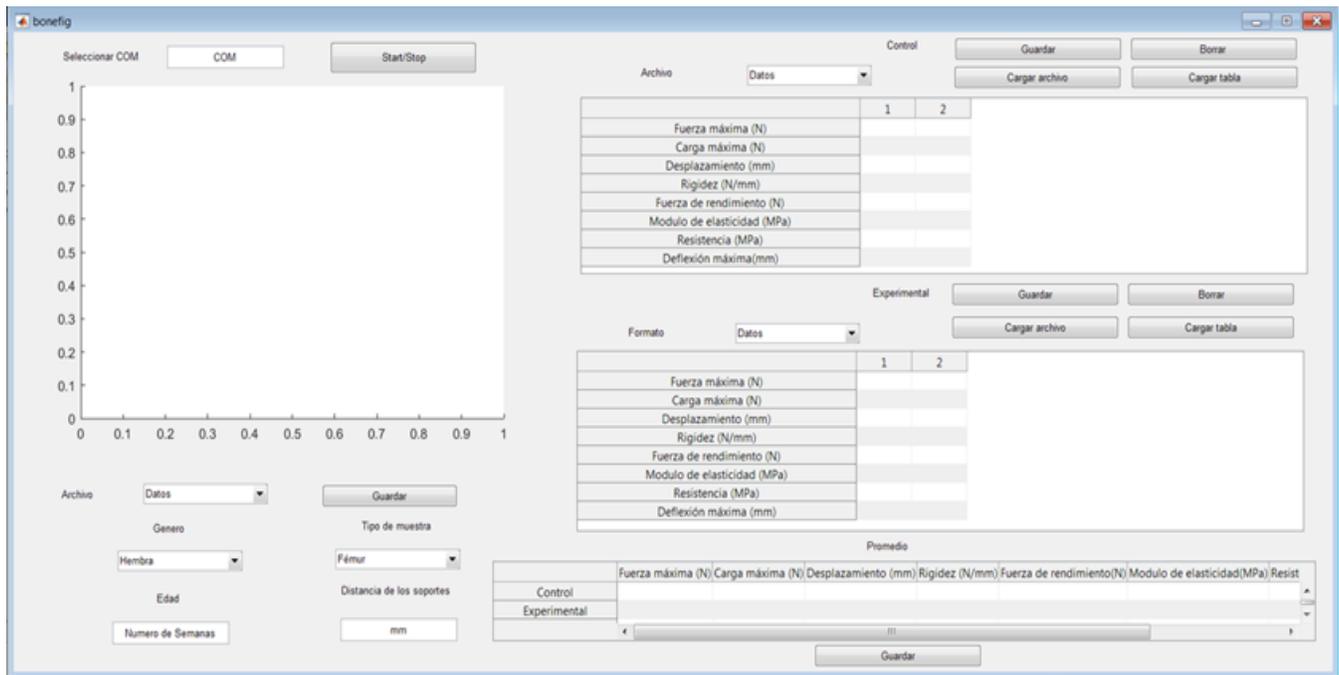


Fig. 11. Interfaz de cálculo para propiedades biomecánicas. Se muestra la vista final de la interfaz terminada con los campos requeridos para registrar los resultados, Del lado derecho se encuentran los apartados en donde se registran los valores obtenidos una vez realizado el análisis, la tabla superior está diseñada para la evaluación de las muestras control, mientras que la tabla inferior está diseñada para el registro de las muestras experimentales, lo cual permite hacer una comparación al momento de las muestras evaluadas, la comparación de muestras control con experimentales, aparecerá en la tabla inferior justo debajo de la tabla de muestras experimentales. De lado izquierdo, se encuentra el eje X, Y en donde aparecerá una gráfica que marcará la presión registrada por el sensor en tiempo real. Finalmente, y de ese mismo lado, se encuentran los apartados que permiten el análisis de las muestras respectivamente, en estos espacios se colocan valores como la distancia de los soportes, el género del ratón al que pertenece nuestra muestra obtenida, la edad del ratón del que la muestra fue obtenida y que es lo que se está analizando (tibia o fémur). **Derechos reservados Laboratorio de neurobiología de las sensaciones orales.**

Para probar el funcionamiento de nuestro sistema, se midieron las propiedades biomecánicas de fémures y tibias de ratones C57BL/6 y BALB/C en condiciones en las que se sabe afectan la fragilidad ósea. Es así como se formaron grupos de huesos deshidratados y su control, así como ratones ovariectomizados y su control.

La deshidratación de los huesos disminuye su peso.

Como primer paso, se determinó el efecto de la deshidratación en el peso de los huesos expuestos a diferentes temperaturas. Observamos que en condiciones normales el hueso mantiene un peso entre 620 mg a 660 mg. Los huesos expuestos a 21° C por 30 minutos no tuvieron cambio en su peso con respecto al control. Los huesos expuestos a 21, 50, 70 y 110°C por 4 horas disminuyeron su peso con respecto al control que se mantuvo a temperatura ambiente el mismo tiempo (Figura 12). Los huesos que perdieron más peso fueron los expuestos a 70°C por 4 horas.

Peso de femur deshidratado

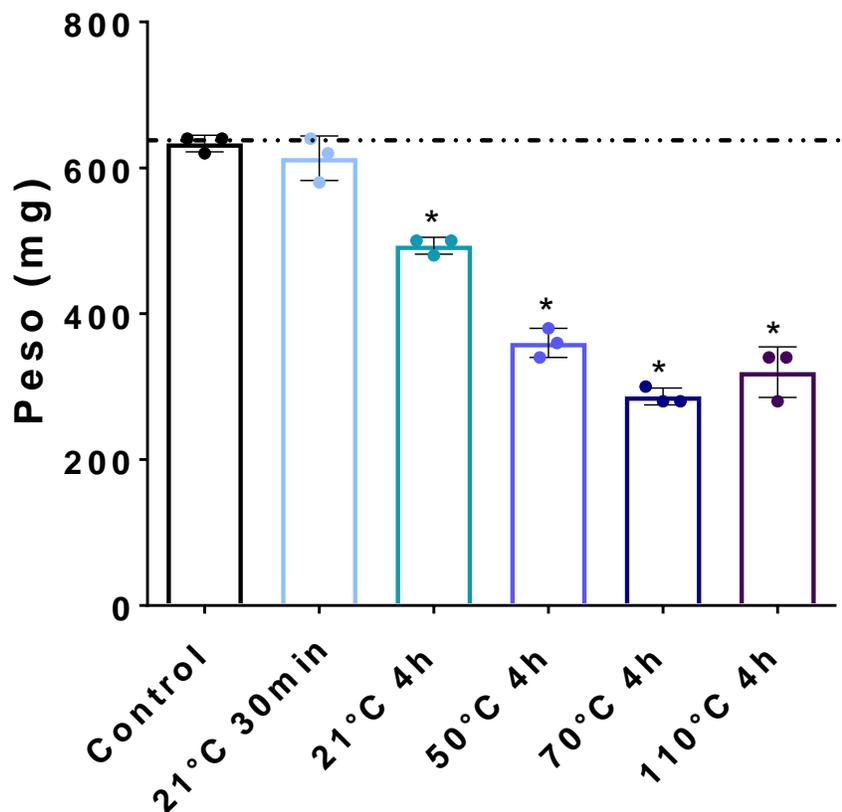


Fig. 12. Comparación del peso de los huesos deshidratados. Gráfica comparativa entre las muestras que fueron deshidratadas a diferentes temperaturas. La línea punteada indica el promedio de los huesos antes de ser deshidratados. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3), * $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey poshoc test. **Elaboración propia.**

Con el objetivo de evaluar la pérdida de agua en relación con la temperatura expuesta se calculó el porcentaje de pérdida de agua en función del peso (figura 13). Tomando como 100% el peso del hueso antes de ser deshidratado. Observamos que a mayor exposición de temperatura mayor pérdida de porcentaje de peso de agua.

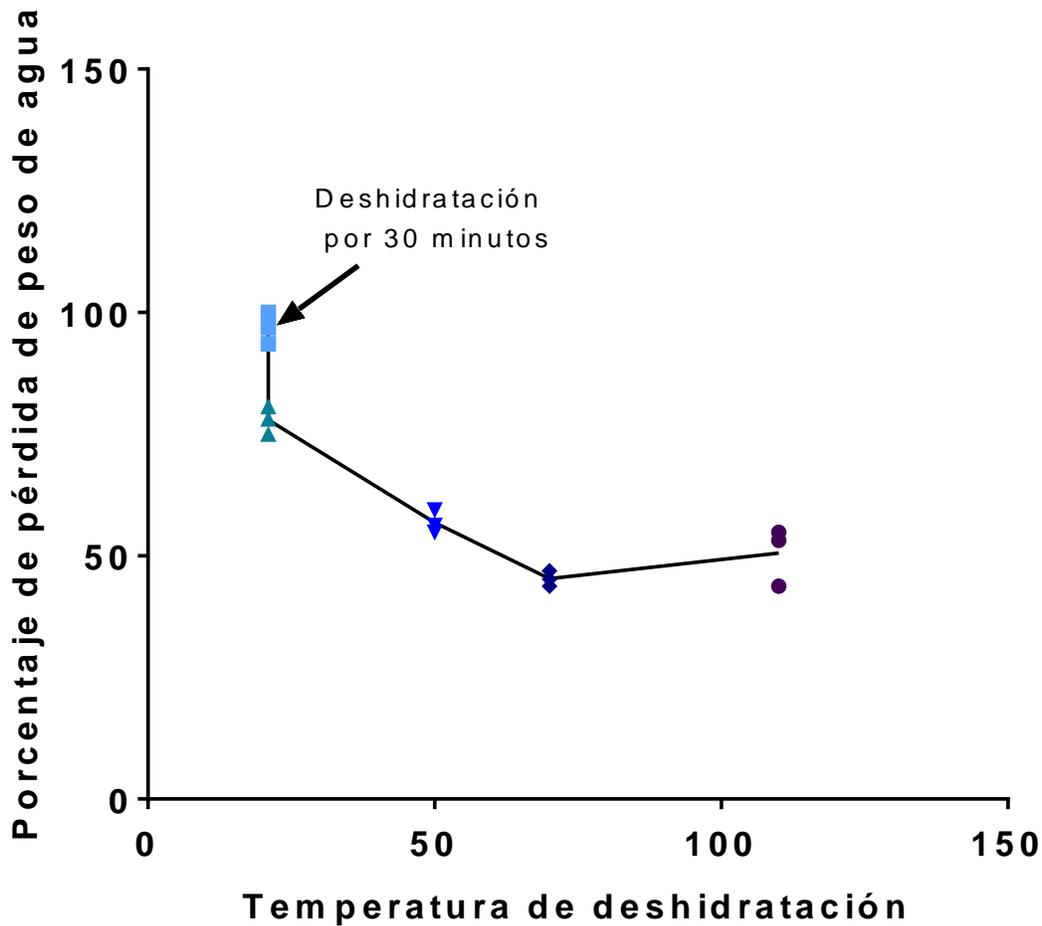


Fig 13. Porcentaje de pérdida de peso de agua con relación a la temperatura. Gráfica de relación entre el porcentaje de agua perdido con respecto a la temperatura en la que los huesos fueron deshidratados, donde se observa que, a mayor temperatura, existe una mayor pérdida de agua. Los datos se representan como la media (n=3). **Elaboración propia.**

Evaluación de las propiedades biomecánicas de los huesos.

El dispositivo construido es capaz de distinguir las alteraciones en las propiedades biomecánicas en huesos deshidratados.

Se realizó la prueba de flexión de tres puntos a las muestras que fueron deshidratadas, de los datos obtenidos se obtuvieron 2 tipos de gráficos, un gráfico para determinar la carga máxima y la fuerza de fractura (figura 14) y otro que determina la elasticidad, la plasticidad y el módulo de elasticidad (figura 15).

Nuestros resultados indicaron que la fuerza o carga máxima (F. max). Es decir, la fuerza de resistencia a la fractura en los huesos controles fue de $(35.0712 \pm 0.19 \text{ N})$, mientras que el punto de fractura (P. fractura) fue de $(33.9139 \pm 1.18 \text{ N})$. Claramente se observa que existe una relación directa entre el aumento de la temperatura con una disminución en la resistencia y rigidez de los huesos. Los huesos mantenidos a 21°C por 30 minutos, tuvieron una F. max de $(20.6562 \pm 0.42 \text{ N})$, su punto de fractura fue de $(20.4419 \pm 0.70 \text{ N})$, mientras que los huesos que permanecieron 4 horas en deshidratación a diferentes temperaturas, mostraron como la fuerza máxima (F. max) y la fuerza necesaria para fracturarlos (P. fractura) disminuye casi al 50% en comparación al control. Los huesos deshidratados a 21°C por 4 hrs, su F. max fue de $(10.9570 \pm 0.01 \text{ N})$, su punto de fractura de $(10.2317 \pm 0.3 \text{ N})$, las muestras deshidratadas a 50°C tuvieron una F. max de $(12.6790 \pm 0.91 \text{ N})$ y un punto de fractura de $(10.6770 \pm 3.09 \text{ N})$. Los huesos deshidratados a 70°C y 110°C por 4 horas la F. Max estuvo por debajo de los 10 N, lo cual significa que existe una mayor tendencia a la fractura, la F. Max de las muestras deshidratadas a 70°C fue de $(9.9253 \pm 0.06 \text{ N})$ y la fuerza con la que ocurrió la fractura fue de $(9.8144 \pm 0.08 \text{ N})$. Finalmente tenemos el grupo de huesos deshidratados a 110°C por 4 hr en donde su fuerza máxima fue de $(6.1523 \pm 0.09 \text{ N})$ y su punto de fractura fue de $(5.4199 \pm 0.25 \text{ N})$.

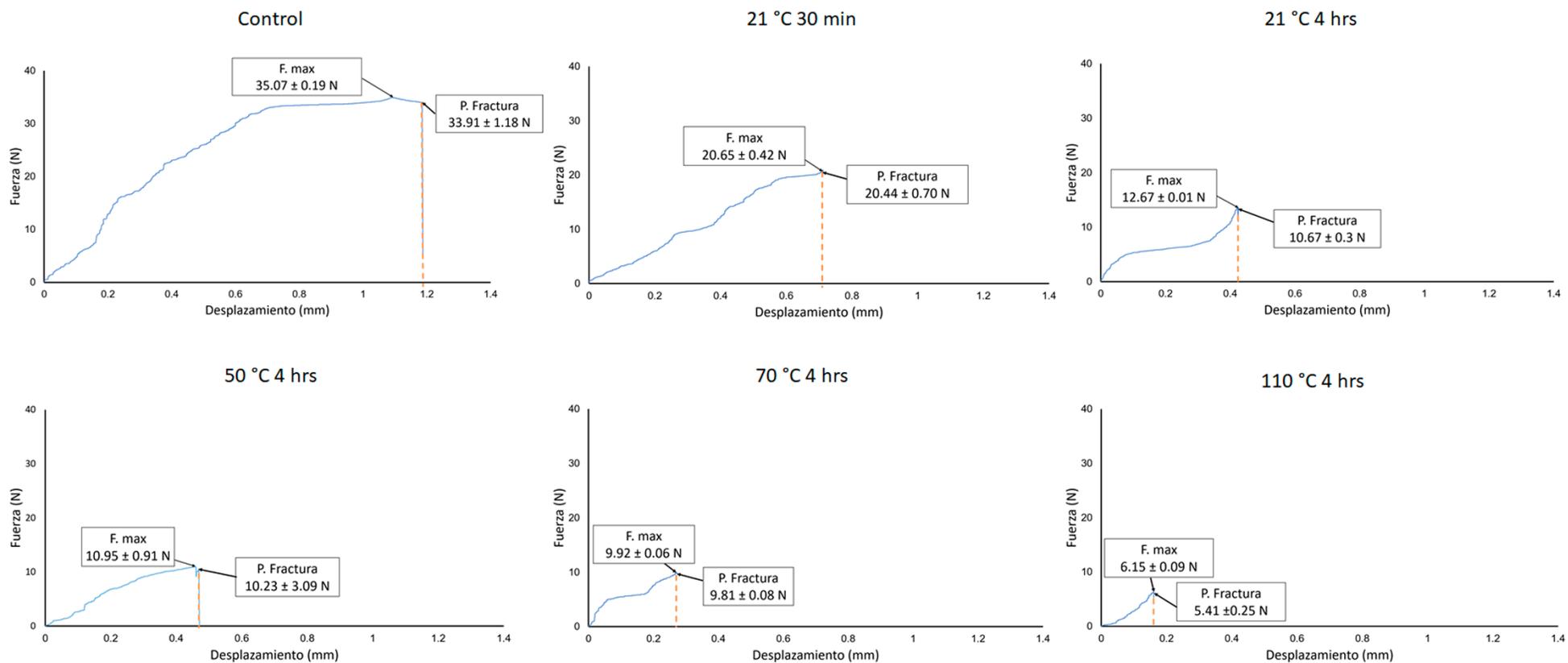


Fig. 14. Fuerza máxima y punto de fractura en hueso deshidratados a diferentes temperaturas por diversos lapsos de tiempo. Se hace una comparación grafica de las curvas obtenidas en el programa Matlab, comparando el punto de fractura y fuerza máxima de carga, en donde puede ver como ambos van disminuyendo con respecto al aumento de la temperatura. Los datos se representan como la media ± DE (n=3). **Elaboración propia.**

En estos mismos huesos deshidratados, se realizó el análisis del esfuerzo que indica el punto de vencimiento del hueso al que la fuerza aplicada produce deformaciones irreversibles en el tejido. De este análisis se obtiene el módulo de elasticidad que indica el punto exacto en el que el hueso ante una fuerza aplicada deja de ser elástico y se comienza a entrar a una fase de deformación irreversible, podemos además observar la región elástica que representa el esfuerzo que se realiza sobre el hueso sin sufrir una deformación permanente y la región plástica que representa el esfuerzo sobre el hueso en el que este se deforma pero resiste la fractura (figura 15).

Observamos que los huesos controles presentan un módulo de elasticidad (ME) de $(829.99 \pm 1.84 \text{ MPa})$. En los huesos deshidratados a 21°C por 30 minutos se observa una disminución en el módulo de elasticidad $(485.60 \pm 4.23 \text{ MPa})$. La disminución de este valor fue mayor para los huesos descalcificados a las diferentes temperaturas por 4 hrs. Los huesos sometidos por 4 horas a 21°C tienen un ME de $(242.39 \pm 14.45 \text{ MPa})$; a 50°C el ME fue de $(130.75 \pm 9.139 \text{ MPa})$; a 70° el ME fue de $(134.37 \pm 5.70 \text{ MPa})$; a 110°C el ME fue de $(129.14 \pm 19.87 \text{ MPa})$ (figura 15)

En las gráficas obtenidas observamos una diferencia importante en la región elástica y plástica de los huesos deshidratados en comparación con los huesos controles (figura 15). Por lo que decidimos obtener el área bajo la curva de la región elástica y plástica con el fin de hacer comparaciones cuantitativas que reflejen la resistencia del hueso a la deformación y fractura (figura 16A y B).

Los huesos control tienen una región elástica de $(71.4866 \pm 1.59 \text{ mm}^2)$ y una región plástica de $(78.64 \pm 2.89 \text{ mm}^2)$ (figura 16 A y B). La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 1.28 (figura 16 C).

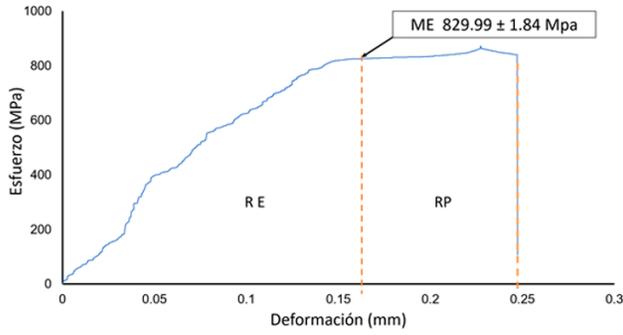
Los huesos sometidos a 21°C por 30 minutos tienen una región elástica significativamente menor en comparación con el control $(29.11 \pm 6.08 \text{ mm}^2)$, su región plástica también es significativamente menor $(8.48 \text{ mm}^2 \pm 3.69 \text{ mm}^2)$ (figura 16 A y B). La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 2.87 (figura 16 C). Lo que indica que estos huesos son más elásticos, pero tienen menor resistencia a la fractura.

Ambas regiones (plástica y elástica) disminuyen significativamente con respecto al control conforme los huesos son expuestos a mayores temperaturas por 4 hrs. La región elástica, para los huesos a 21°C fue de $(1.8796 \pm 0.30 \text{ mm}^2)$ y una región plástica de $(7.05 \pm 3.18 \text{ mm}^2)$ (figura 16 A y B). La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 0.16 (figura 16 C). Lo que indica que estos huesos son igualmente menos elásticos y tienen una menor resistencia a la fractura en comparación con los controles. Los huesos sometidos a 50°C tuvieron una región elástica de $(5.2496 \pm 3.3990 \text{ mm}^2)$ y una región plástica de $(11.8766 \pm 0.65 \text{ mm}^2)$ (figura 16 A y B). La relación

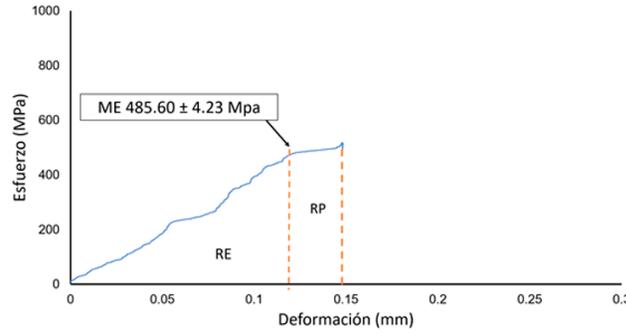
que guarda la elasticidad y plasticidad es de 0.90 (figura 16 C). Lo que indica que estos huesos son menos elásticos, pero tienen mayor resistencia a la fractura.

Tanto el grupo deshidratado a 70°C como el de 110°C por 4 horas mostraron una disminución de casi un 90% en su límite elástico y resistencia. Los huesos deshidratados a 70°C tienen una región elástica de $(1.2421 \pm 0.42 \text{ mm}^2)$ y una región plástica de $(7.0333 \pm 0.33 \text{ mm}^2)$ (figura 16 A y B). La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 0.60 (figura 16 C) Lo que indica que estos huesos son menos elásticos, pero tienen mayor resistencia a la fractura. Finalmente, el grupo deshidratado a 110°C tuvo una región elástica de $(1.2786 \pm 0.04) \text{ mm}^2$ y una región plástica de $(0.6776 \text{ mm}^2 \pm 0.21 \text{ mm}^2)$ (figura 16 A y B). La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 2.24 (figura 16 C). Lo indica que estos huesos son menos elásticos y tienen una menor resistencia a la fractura en comparación con los controles

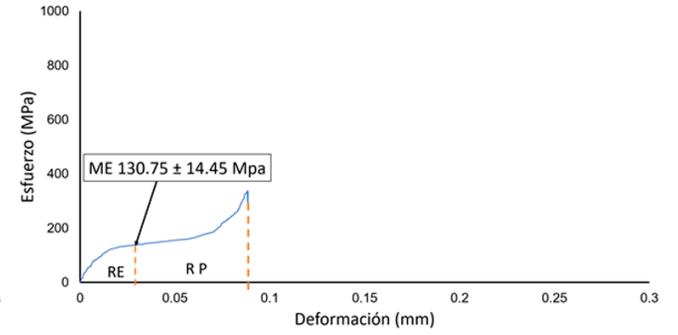
Control



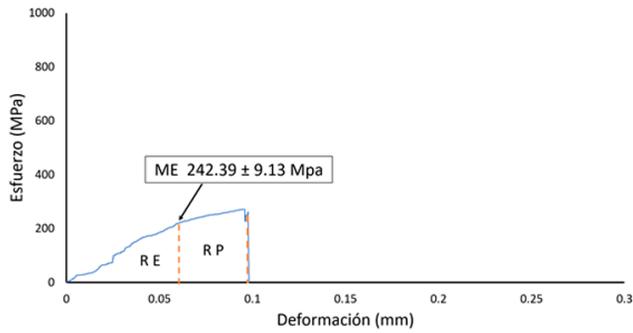
21 °C 30 min



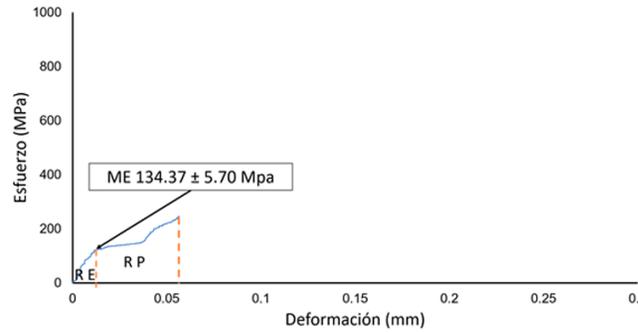
21 °C 4 hrs



50 °C 4 hrs



70 °C 4 hrs



110 °C 4 hrs

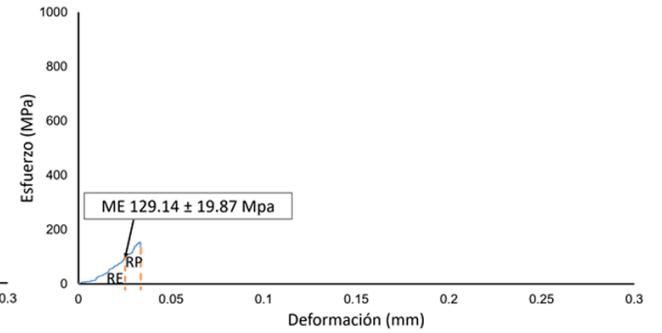


Fig. 15. Comparación del esfuerzo, región elástica y plástica en huesos deshidratados. Se muestran las curvas obtenidas por medio del programa Matlab en donde se comparan la elasticidad, plasticidad y módulo de elasticidad; se puede observar que la deshidratación ocasiona la pérdida de elasticidad, plasticidad y módulo de elasticidad. Los datos se representan como la media ± DE (n=3). **Elaboración propia.**

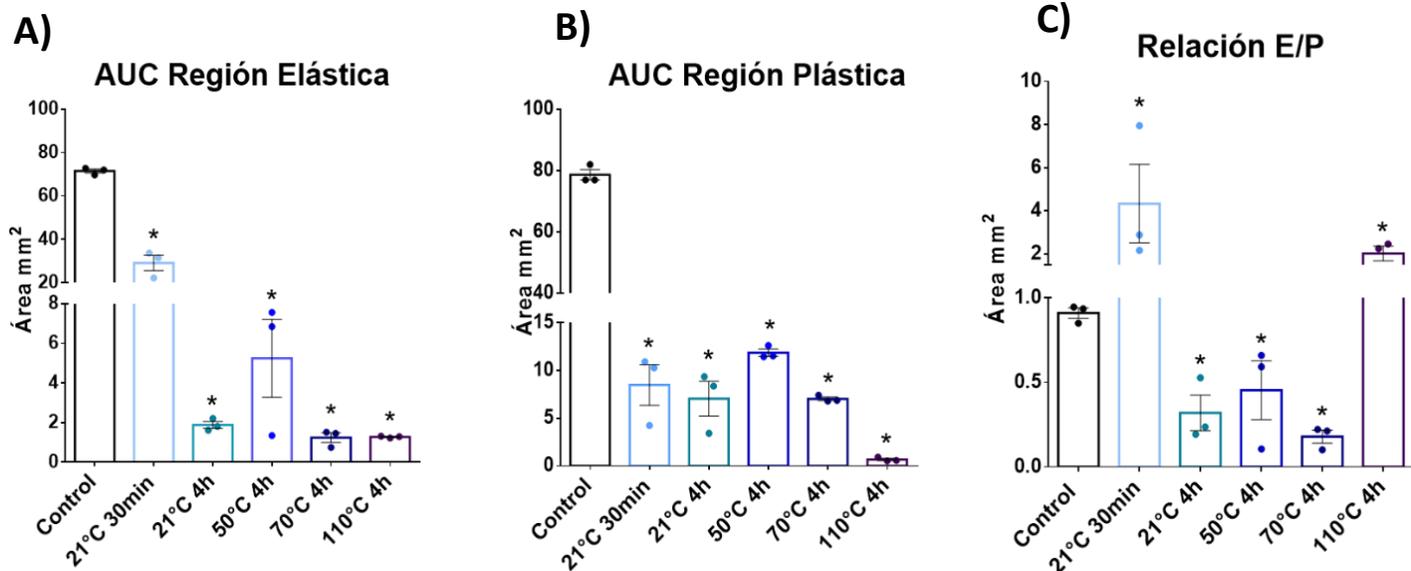
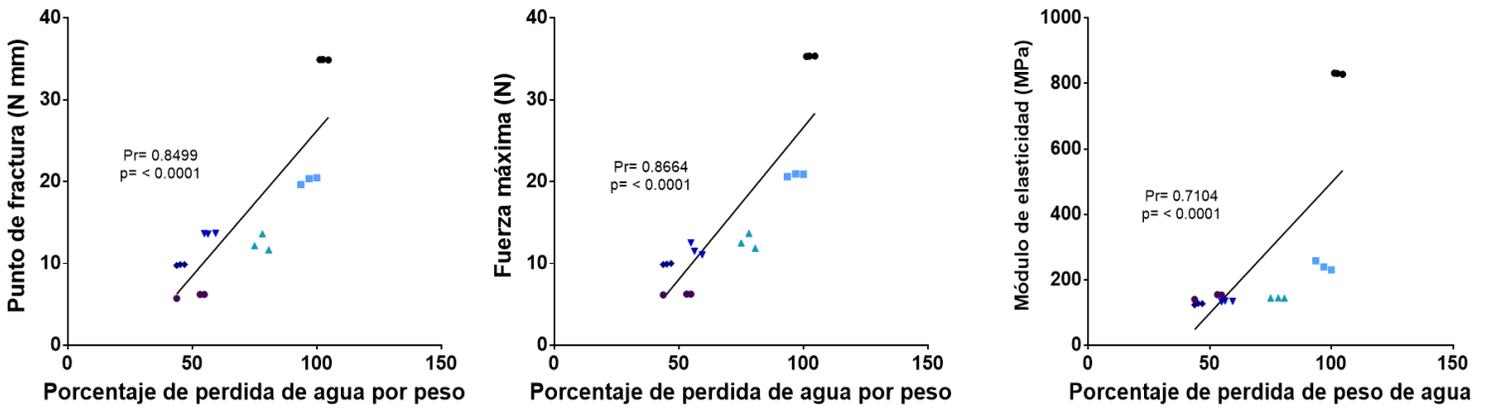


Fig.16. Área bajo la curva de la región elástica (A) y plástica (B) y la relación entre las regiones (C).

Gráficos que muestran la región elástica, plástica y la relación entre ambas. **Grafica A)**; se muestra el área bajo la curva tomada únicamente de la región elástica, donde se observa diferencias significativas entre las muestras deshidratadas por cuatro horas con respecto a las muestras deshidratadas por treinta minutos y las muestras control. **Grafica B)**; se muestra el área bajo la curva tomada únicamente de la región plástica donde se observan diferencias significativas entre las muestras deshidratadas con las muestras control. **Grafica C)**; se muestra la relación entre el área bajo la curva de la región elástica, con la región plástica. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3), * $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey poshoc test. **Elaboración propia.**

Con el objetivo de analizar si existe correlación entre la deshidratación y la disminución de las propiedades biomecánicas, se realizaron correlaciones estadísticas entre el porcentaje de pérdida de agua, la fuerza máxima, el punto de fractura y el módulo elástico (figura 17).

Observamos que existe una correlación positiva entre el porcentaje de pérdida de agua con el punto de fractura (Pr 0.847; $p < 0.0001$), la fuerza máxima (Pr 0.842; $p < 0.0001$), y el módulo de elasticidad (Pr 0.898; $p < 0.0001$). Lo que significa que, a menor porcentaje de agua, el hueso presenta menor resistencia a la fractura y se deforma más fácilmente (figura 17).



● Control ■ 21 °C 30 min ▲ 21 °C 4 hrs. ▼ 50 °C 4 hrs. ◆ 70 °C 4 hrs. ● 110 °C 4 hrs.

Fig. 17. Correlación de la pérdida de agua por peso con las propiedades biomecánicas Gráficas de relación entre las muestras que fueron deshidratadas a diferentes temperaturas. Los datos se representan la fuerza de fractura, carga máxima y módulo elástico (n=3), Pearson r^* $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey poshoc test . **Elaboración propia.**

El dispositivo es capaz de distinguir los cambios en las alteraciones en las propiedades biomecánicas de huesos osteoporóticos.

Con el objetivo de probar la sensibilidad de nuestro equipo, medimos las propiedades biomecánicas óseas de ratonas sometidas a ovariectomía (que se sabe que desarrollan osteoporosis por deficiencia de estrógenos) y sus controles (sham).

Observamos que los huesos de las ratonas con ovariectomía presentan una disminución significativa en la fuerza máxima (F. Max 23.08 ± 0.15 N) y en el punto de fractura (P. Frac 21.72 ± 0.04 N) en comparación con los huesos de los ratones sham (F. Max 30.16 ± 0.30 N; P. Frac 28.79 ± 0.12 N) (figura 18 y 20)

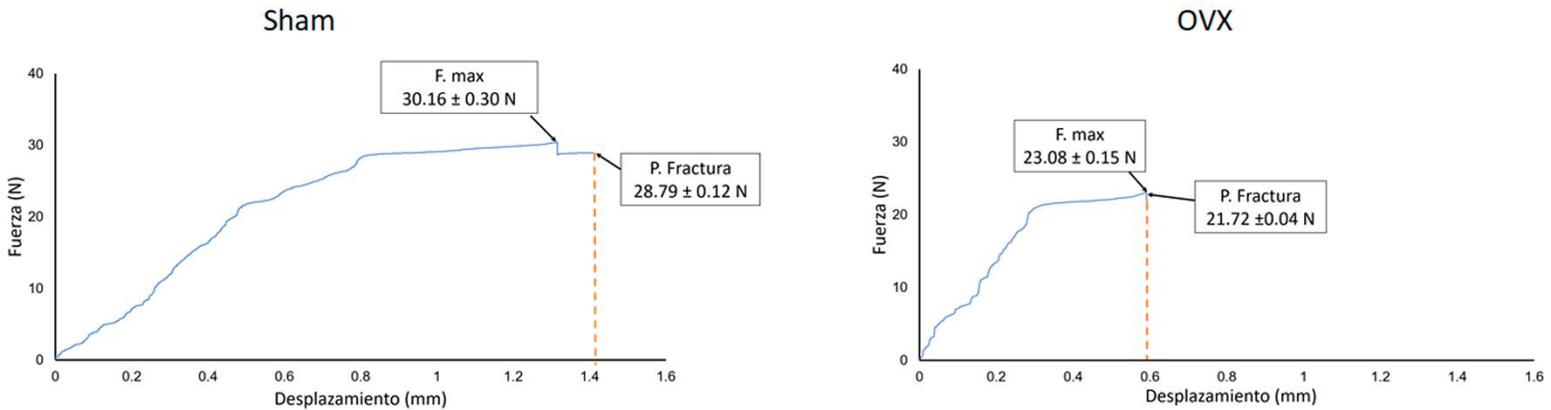


Fig. 18. Comparación de la fuerza máxima y punto de fractura en huesos de ratones con ovariectomía de 7 semanas. Se hace una comparación grafica de las curvas obtenidas en el programa Matlab, comparando el punto de fractura y fuerza máxima de carga, en donde podemos ver que los huesos de ratones con ovariectomía muestran menor resistencia que los huesos control. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3). **Elaboración propia.**

Se realizó la prueba de esfuerzo para evaluar el módulo de elasticidad la región plástica y elástica de las cuales también se obtuvo el área bajo la curva para hacer comparaciones cuantitativas.

Observamos que los huesos de las ratonas con ovariectomía presentan una disminución significativa en el módulo de elasticidad (529.86 ± 3.19 MPa), menor región elástica (18.46 ± 12.46 mm²) y menor región plástica (30.55 ± 12.46 mm²) en comparación con los huesos de ratones sham M. Elástico (706.66 ± 17.1 MPa; región elástica 72.6666 ± 12.46 mm²; región plástica 78.7433 ± 11.86 mm²) (Figura 19 y 20). La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 0.94 para los ratones con ovariectomía y de 0.60 para los ratones sham. (Figura 21 A, B y C).

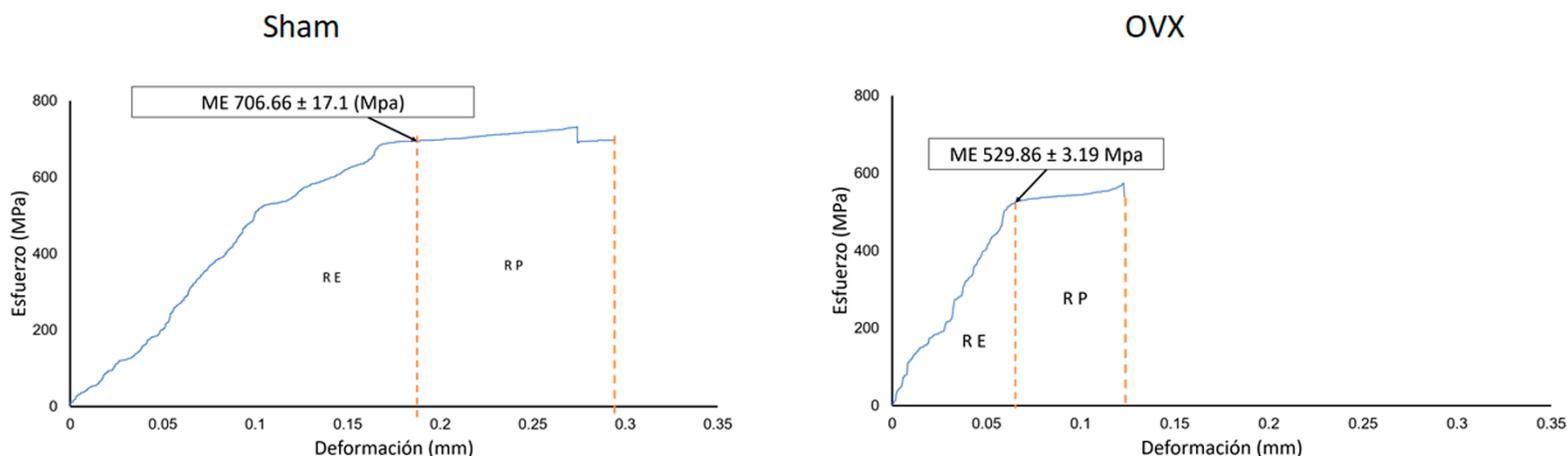


Fig. 19. Comparación elasticidad, plasticidad y módulo de elasticidad en huesos de ratones con ovariectomía de 7 semanas. Se muestran las curvas obtenidas por medio del programa Matlab en donde se comparan la elasticidad, plasticidad y módulo de elasticidad de huesos obtenidos de ratones con ovariectomía de 7 semanas, se puede observar un comportamiento similar, sin embargo, la resistencia de los huesos con ovariectomía se ve disminuida con respecto a los huesos control, además se observa que la plasticidad se ve considerablemente disminuida en comparación con los huesos control. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3). **Elaboración propia.**

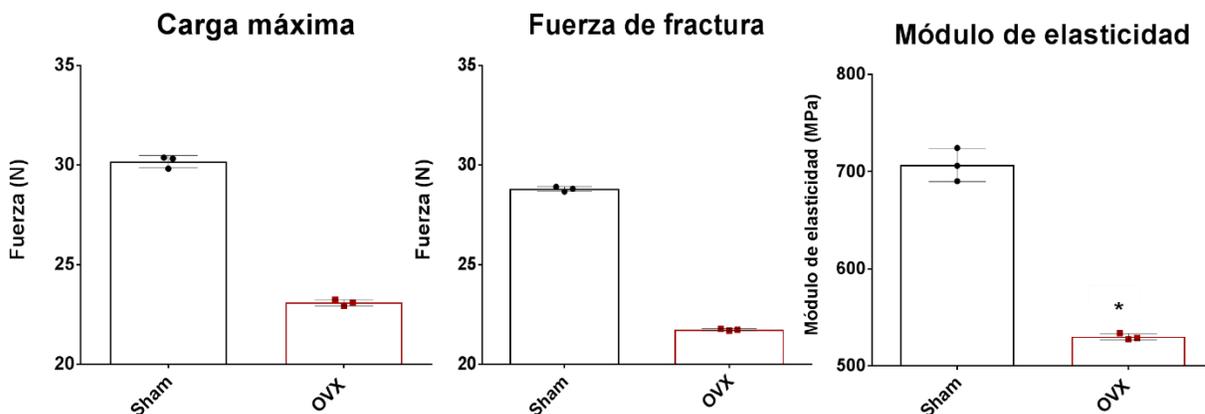


Fig. 20. Comparación de la fuerza máxima, punto de fractura y módulo elástico de huesos de ratones con ovariectomía de 7 semanas. Se muestra una comparación de los datos obtenidos para la fuerza máxima (F. max), punto de fractura (P. frac) y módulo de elasticidad de huesos obtenidos de ratones con ovariectomía, los resultados no mostraron diferencias significativas entre las muestras control y las muestras con ovariectomía, a excepción del módulo de elasticidad, en donde el grupo con ovariectomía muestra una diferencia significativa. Los datos muestran la media \pm DE * $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey poshoc test . **Elaboración propia.**

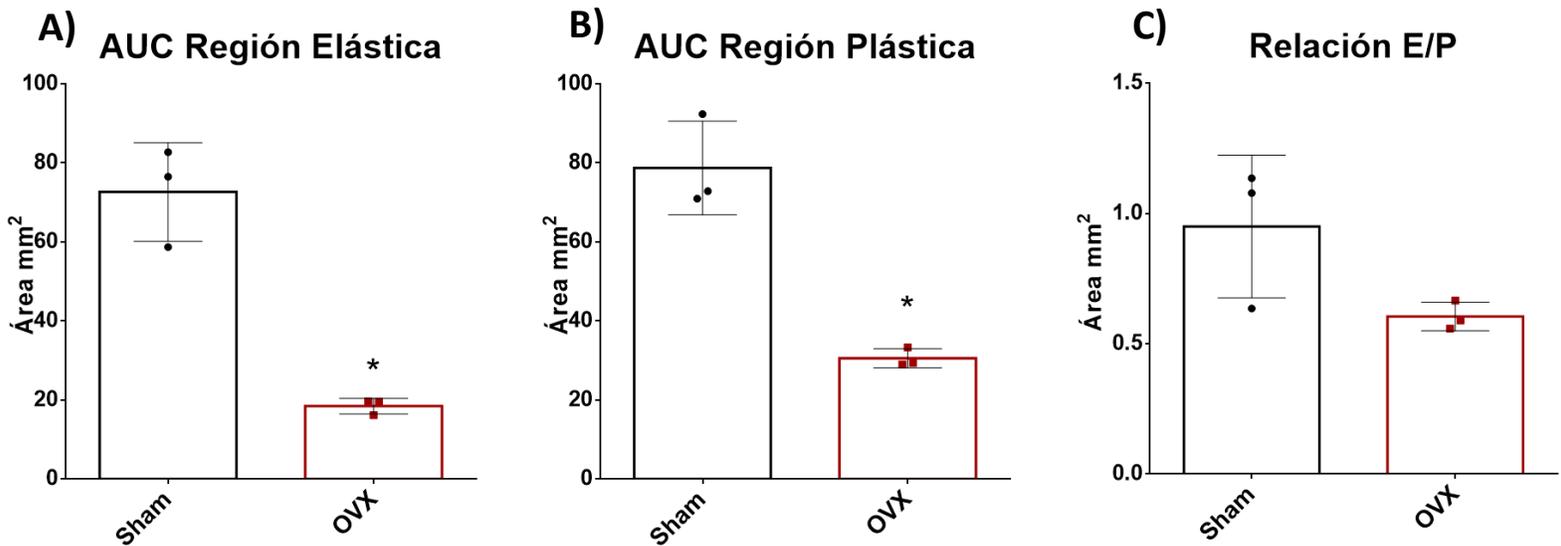


Fig. 21. Área bajo la curva de la región elástica (A) y plástica (B) y la relación entre las regiones (C). Gráficos que muestran la región elástica, plástica y la relación entre ambas. **Grafica A)**; se muestra el área bajo la curva tomada únicamente de la región elástica, donde se observa diferencias significativas entre las muestras obtenidas de los ratones con cirugía de ovariectomía con los ratones sham. **Grafica B)**; se muestra el área bajo la curva tomada únicamente de la región plástica donde se observan diferencias significativas entre las muestras obtenidas de los ratones con cirugía de ovariectomía con los ratones sham. **Grafica C)**; se muestra la relación entre el área bajo la curva de la región elástica, con la región plástica de los ratones con ovariectomía con los ratones sham. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3), * $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey posthoc test. **Elaboración propia.**

El dispositivo es capaz de medir las propiedades mecánicas de materiales dentales.

Finalmente decidimos también evaluar las propiedades mecánicas de algunos materiales de uso odontológico con el fin de probar la capacidad de nuestro sistema.

Se confeccionaron réplicas de fémur de ratón con resina fotocurable, resina fluida, acrílico dental y yeso velmix tipo III y se les midió sus propiedades mecánicas. Observamos que las réplicas de resina fotocurable, como fuerza máxima, pueden soportar (20.70 ± 0.19 N), mientras que su punto de fractura es de (20.08 ± 0.39 N), el grupo de réplicas confeccionadas con resina fluida, arroja valores para la fuerza máxima de (18.50 ± 0.47 N), mientras que su punto de fractura fue de (18.03 ± 0.58 N), los valores obtenidos para las réplicas confeccionadas con acrílico arrojaron para su fuerza máxima (16.22 ± 1.11 N), mientras que su punto de fractura fue de (15.90 ± 1.17 N), finalmente las réplicas confeccionadas con yeso, muestran los valores más bajos obteniendo para su fuerza máxima fueron de (12.8763 ± 0.07) y su punto de fractura de (12.75 ± 0.17 N) (figura 22 y 24).

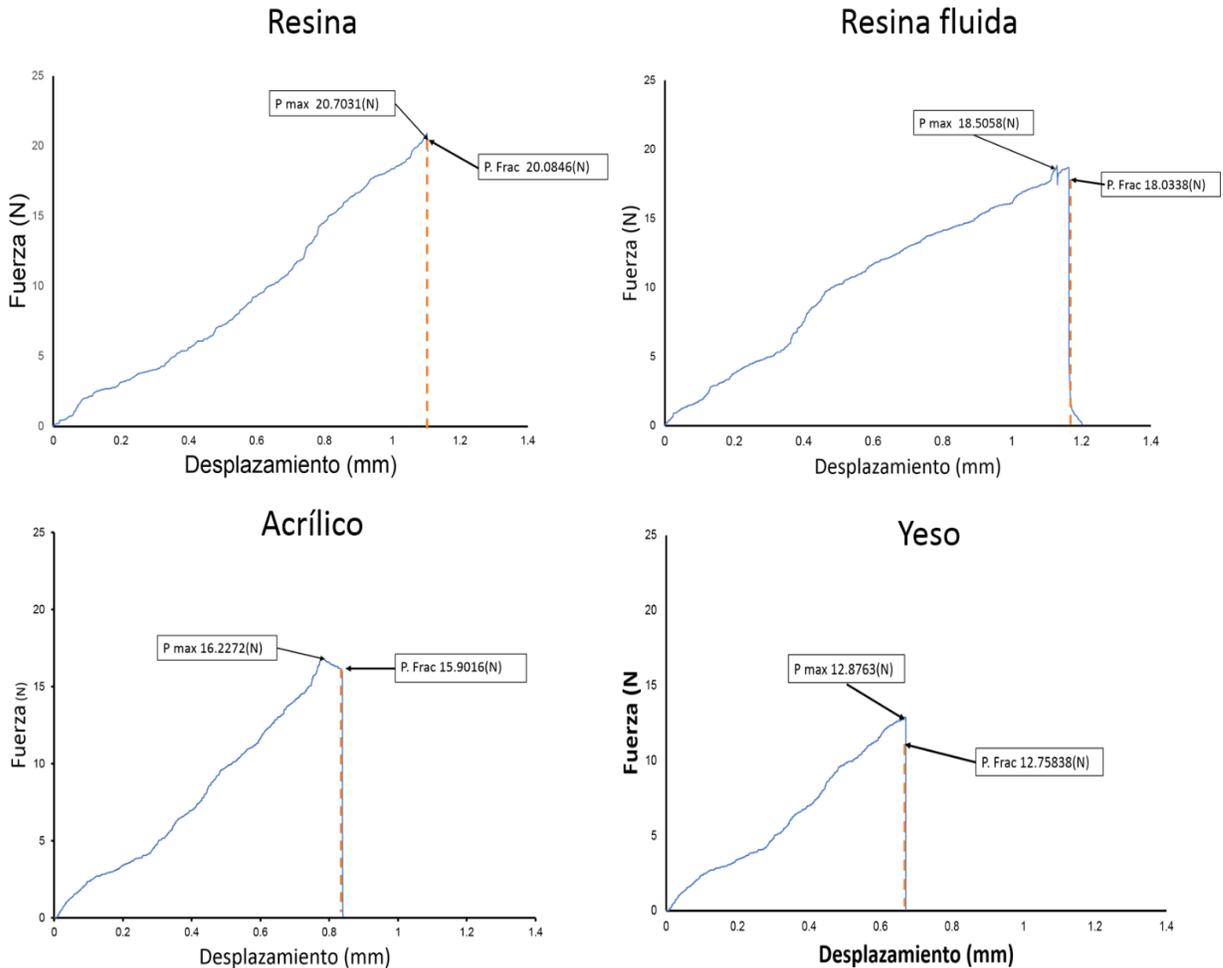


Fig. 22. Comparación de la fuerza máxima y punto de fractura de réplicas confeccionadas con materiales de uso odontológico. Se muestra una comparación gráfica de los datos obtenidos en el programa Matlab, comparando el punto de fractura y Fuerza máxima de carga de diversos materiales como resina fotocurable, resina fluida, acrílico y yeso, se observa que los presentan un comportamiento lineal, así como tanto su fuerza máxima de carga y punto de fractura disminuyen según el tipo de material evaluado. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3). **Elaboración propia.**

Se realizó un análisis de la elasticidad, plasticidad y el módulo de Young de las réplicas el cual también mostro diferentes valores para todas las muestras, en la figura 23 se muestran las curvas con las propiedades mecánicas de las réplicas confeccionadas con resina fotocurable, resina fluida, acrílico y yeso. Observamos que la resina tiene una elasticidad (E) de 439.33 ± 43.5 , la resina fluida E: 413 ± 6.86 , el acrílico E: 385.82 ± 36.32 y para el yeso E: 317.99 ± 0.60 (figura 23 y 24).

Se analizó el área bajo de curva de las regiones plásticas y elásticas (figura 25). La región elástica para la resina es de $39.23 \text{ mm}^2 \pm 8.87$ y la región plástica es de $11.81 \text{ mm}^2 \pm 2.67$. La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 5.19; para la resina fluida, la región elástica es de $46.8133 \text{ mm}^2 \pm 4.34$ y la región plástica de $13.5 \text{ mm}^2 \pm 2.67$. La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 3.59. El acrílico tiene una región elástica de $36.4966 \text{ mm}^2 \pm 1.76$ y una región plástica de $(3.056 \text{ mm}^2 \pm 1.33)$. La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 13.75. El yeso tiene una región elástica de $4.192 \text{ mm}^2 \pm 12.59$ y una región platica de $2.1751 \text{ mm}^2 \pm 2.31$. La relación que guarda la elasticidad y plasticidad es de 57.4.

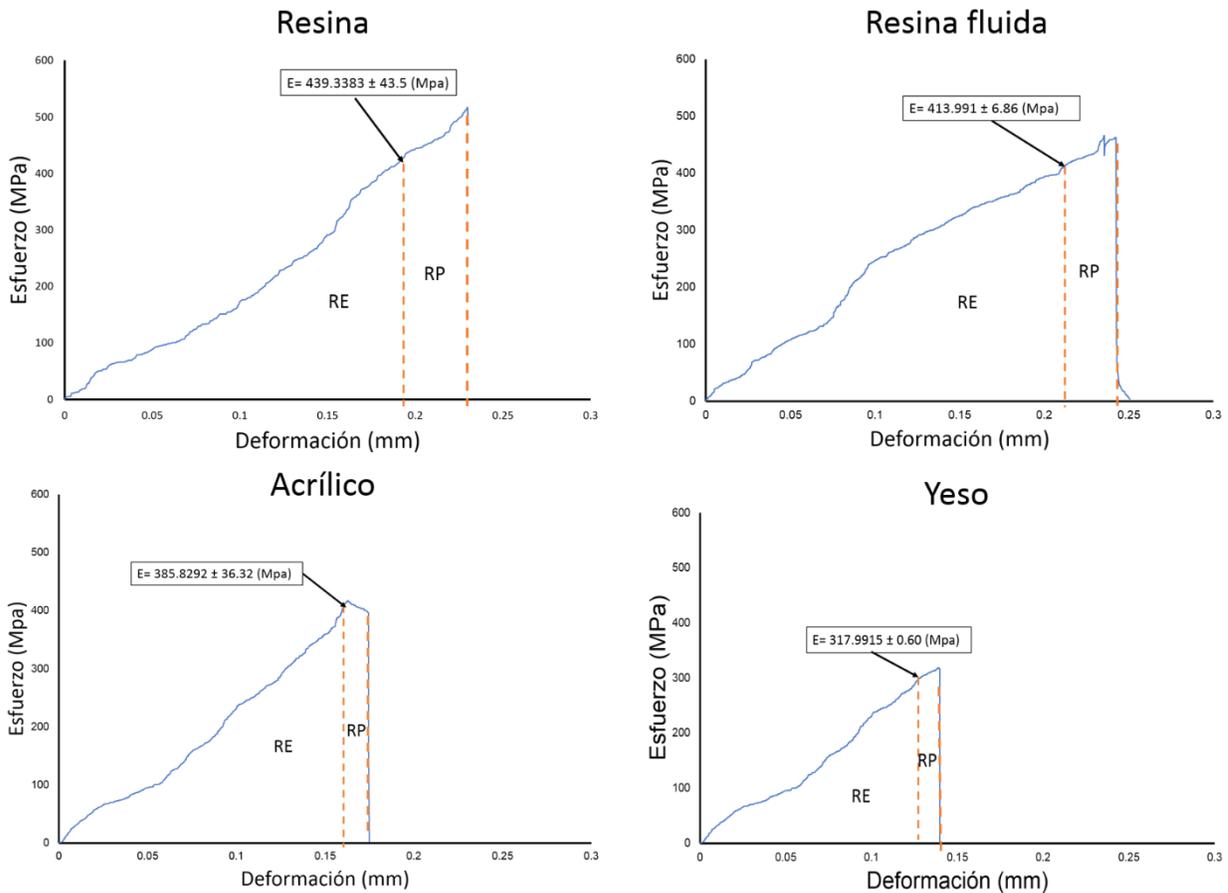


Fig. 23. Comparación elasticidad, plasticidad y módulo de elasticidad en huesos de réplicas de ratones confeccionadas con materiales de uso odontológico. Se muestran los datos obtenidos por medio del programa Matlab en donde se comparan la elasticidad, plasticidad y módulo de Young de huesos confeccionados con diversos materiales de uso odontológico como resina fotocurable, resina fluida, acrílico y yeso, se observa un comportamiento lineal, sin embargo, la resistencia para cada material es diferente para uno, no obstante, todos muestran un comportamiento elástico – plástico similar, esto es debido a las características de cada material. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3). **Elaboración propia.**

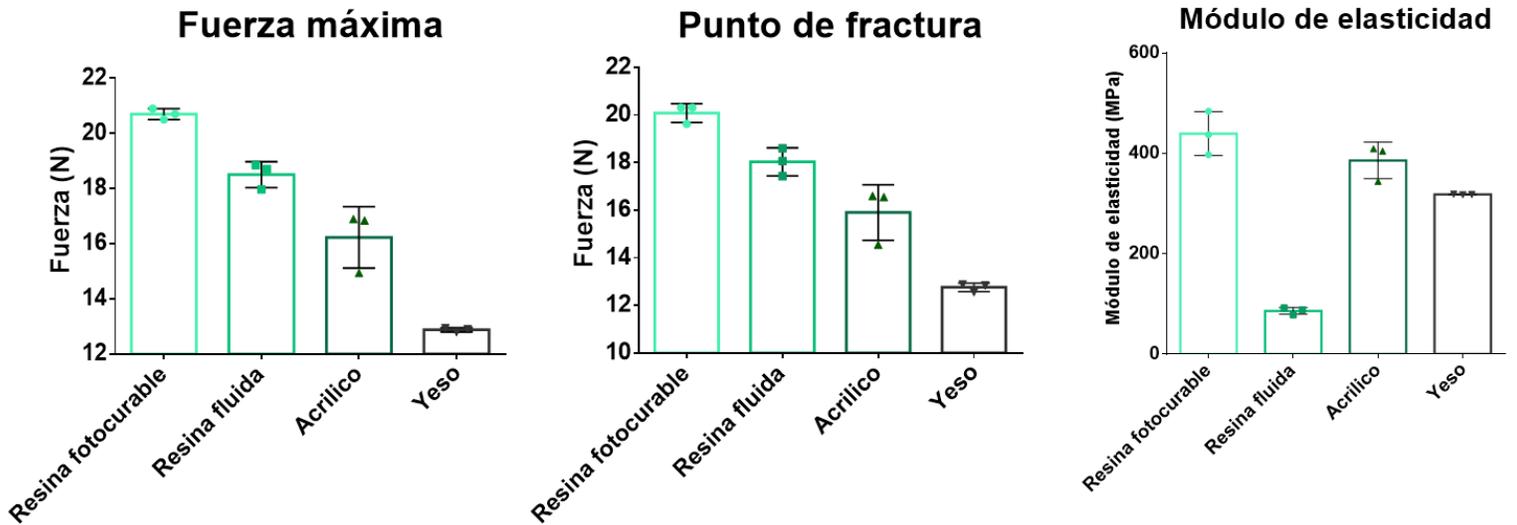


Fig. 24. Comparación de la fuerza máxima, punto de fractura y modulo elástico de réplicas confeccionadas con diversos materiales de uso odontológico. Se muestra una comparación de la media y SD obtenidos para la fuerza máxima (F. max), punto de fractura (P. frac) y módulo de elasticidad de réplicas de huesos confeccionadas con diversos materiales de uso odontológico como resina fotocurable, resina fluida, acrílico y yeso. Se realizó una comparación entre las propiedades mecánicas de estos materiales, mostrando diferencias significativas entre todos los grupos evaluados, una $p \leq 0.0001$, mostrando así que el material con mayor resistencia es la resina fotocurable, seguido de la resina fluida y el acrílico, siendo el yeso el material más débil. Los datos se representan como la media ($n=3$), * $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey poshoc test. **Elaboración propia.**

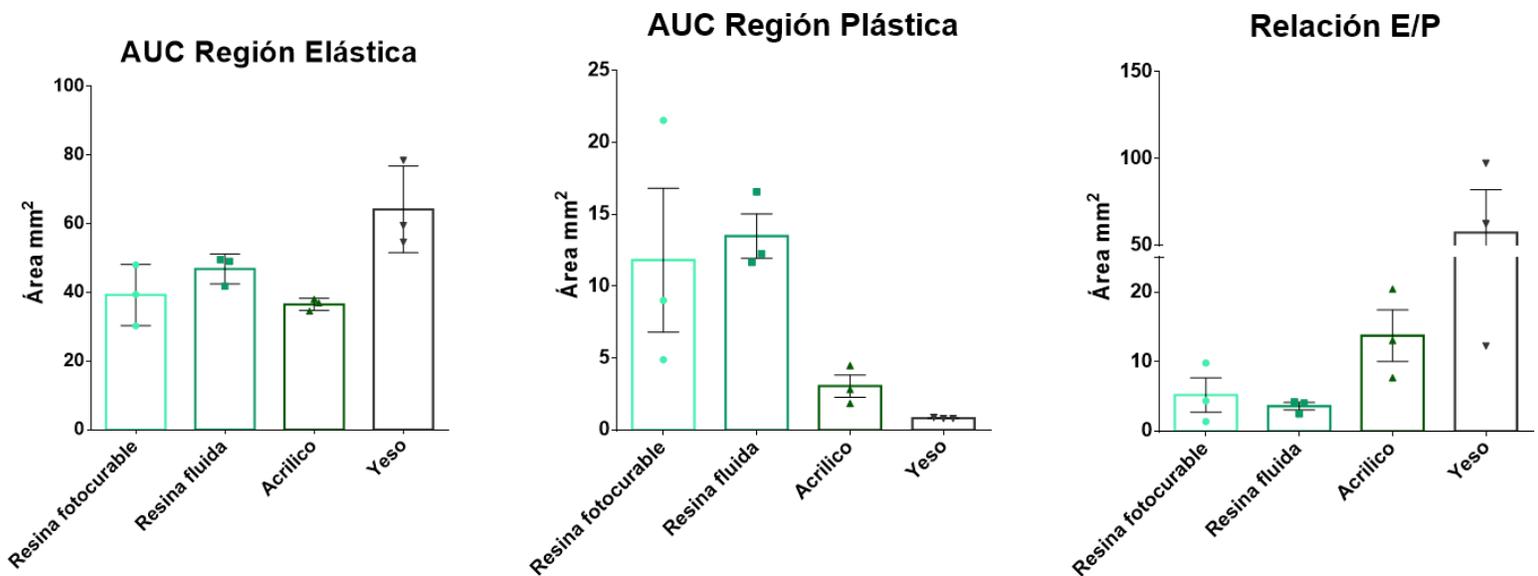


Fig. 25. Área bajo la curva de la región elástica (A) y plástica (B) y la relación entre las regiones (C). Gráficos que muestran la región elástica, plástica y la relación entre ambas. Gráfica A); se muestra el área bajo la curva tomada únicamente de la región elástica, donde se observa diferencias significativas entre las réplicas confeccionadas con yeso, resina fluida y acrílico con respecto a las muestras confeccionadas con resina fotocurable. Gráfica B); se muestra el área bajo la curva tomada únicamente de la región plástica de las réplicas confeccionadas con resina fotocurable, resina fluida, acrílico y yeso, no mostraron diferencias significativas. Gráfica C); se observa la relación entre la región elástica y plástica de los materiales evaluados. Los datos se representan como la media \pm DE ($n=3$). * $p \leq 0.0001$ ANOVA and Tukey poshoc test. **Elaboración propia.**

DISCUSIÓN

El uso de sistemas que permiten medir las propiedades biomecánicas de los huesos, es fundamental ya que las pruebas biomecánicas del hueso constituyen una oportunidad de evaluar el impacto funcional de las alteraciones en la masa, geometría y remodelación ósea.

Las cualidades biomecánicas de un hueso, dependen de múltiples factores como la dirección y la magnitud de las fuerzas aplicadas, la geometría ósea (dimensión y forma) y su composición (15). Sin embargo, para el estudio de las propiedades biomecánicas óseas, es necesario el uso de sistemas que permitan registrar el valor de cada propiedad.

En este trabajo confeccionamos un sistema de flexión de tres puntos de bajo costo y con la sensibilidad necesaria que nos permitiera evaluar las propiedades biomecánicas de los huesos, de una forma sencilla, ya que la evaluación precisa de la calidad ósea puede predecir potencialmente el riesgo de fractura ósea.

Una de las razones por las que se optó por la confección de un sistema de tres puntos y no otro tipo de sistema, fue porque los sistemas de flexión de tres puntos, permiten el análisis de muestras pequeñas, si bien este tipo de sistemas están diseñados para la evaluación de huesos largos, no se requiere que la muestra tenga un gran tamaño.

El sistema fue confeccionado basado en las características de los sistemas de flexión de tres puntos ya existentes en el mercado, tales como los sistemas creados por INSTRON que tienen como objetivo medir las propiedades mecánicas de materiales.

Por otra parte, tenemos el 3-Point and 4-Point Bend Fixture 2810-600/605 (33) que es un sistema también creado por INSTRON, cuya fuerza al ser muy baja, permite un análisis más detenido de la respuesta de los materiales a una fuerza externa, sin embargo, al igual que los sistemas anteriores, este sistema está indicado para la evaluación de pequeños plásticos, madera y composites, no obstante, existe un sistema confeccionado por esta misma empresa que si permite hacer una evaluación de los huesos, el sistema ElectroPuls™ permite hacer pruebas estáticas de baja velocidad y pruebas de fatiga un sistema de tres puntos permite conocer de igual forma las características biomecánicas de un hueso sin requerir que la muestra sea de un tamaño específico.

Las desventajas de los sistemas de flexión de tres puntos desarrollados antes expuestos, son que requieren de un manejo especializado, están indicados para el análisis de materiales de construcción, requieren de mantenimiento costoso, capacitación de personal especializado e infraestructura adecuada para el equipo y aunque con aditamentos especiales, este tipo de sistemas pueden ser utilizados para medir propiedades biomecánicas óseas, su principal objetivo es la medición de propiedades mecánicas de materiales de construcción y podrían arrojar resultados poco confiables, el optar por el uso de este tipo de sistemas, ya que la colocación de

los aditamentos necesarios para hacer las mediciones correspondientes es crucial para no alterar los valores obtenidos.

El sistema de flexión de tres puntos que nosotros realizamos está diseñado especialmente para evaluar las propiedades biomecánicas de muestras biológicas y observamos que también puede medir propiedades mecánicas de algunos materiales de uso odontológico.

En la primera fase de nuestra investigación que fue la confección del sistema de flexión de tres puntos en colaboración con el departamento de bioelectrónica del CINVESTAV IPN y el laboratorio de biología de las sensaciones orofaciales de la FES Iztacala UNAM. Los resultados obtenidos mostraron que se requiere de un equipo multidisciplinario para la elaboración e implementación de este tipo de equipos.

Notamos que es de gran importancia el control en la colocación de la muestra biológica en el sistema, ya que las mediciones pueden variar debido a la morfología y estructura propia del hueso. Esto coincide con lo reportado por Silva et al y Meulen en donde evalúan el cambio de las propiedades de los huesos en dependencia con su morfología (31, 32) Además de eso, factores como la posición de los soportes sobre los que se coloca la muestra y la velocidad a la que ocurre la flexión, pueden afectar directamente el resultado obtenido (33).

Una vez construido el sistema y la interfaz, se analizaron las muestras que fueron deshidratadas. Observamos que las propiedades como la elasticidad y plasticidad fueron modificadas con el tiempo que pasaron en deshidratación, un ejemplo de esto son las muestras que tuvieron pérdida de agua a una temperatura ambiente, sin embargo su susceptibilidad a la fractura es mayor que la de un hueso sano, por otro lado las muestras que pasaron un mayor tiempo en deshidratación, modificaron su comportamiento elástico-plástico mostrando una mayor región elástica y una región plástica casi nula, sin embargo esto no quiere decir que el hueso sea más resistente, ya que tanto la carga máxima, fuerza necesaria a la fractura y el módulo elástico, se ven drásticamente reducidos, por lo que el hecho de que la elasticidad sea mayor que la plasticidad, indica que el hueso no tendrá una fase en la que siga soportando una carga constante y una vez que este rebasa su límite elástico, ocurrirá una fractura inminente.

Los cambios en la fragilidad en los huesos deshidratados puede ser debido a que el agua encontrada en la matriz extracelular ósea disminuye, lo cual puede disminuir la interacción del agua con el colágeno. Y repercutir en la pérdida de resistencia ósea, ya que se ha reportado que la asociación entre el agua y las fibras de colágeno proporciona resistencia al hueso (22, 27).

Por lo que, nuestros resultados indican que el sistema construido tiene la capacidad de medir las propiedades mecánicas de huesos deshidratados, reflejo de la interacción de la matriz extracelular.

En la evaluación de los huesos de ratones con cirugía de ovariectomía, los resultados mostraron que la deficiencia de estrógenos gonadal causa fragilidad ósea, ya que la deficiencia de esta hormona causa un incremento de la reabsorción ósea y por lo tanto adelgazamiento de la cortical ósea (18). Nuestros resultados indican que los huesos de los ratones ovariectomizados, tienen un comportamiento elástico plástico similares a las de un hueso sano, sin embargo, la resistencia que los huesos de ratones con ovariectomía presentan es mucho menor que la de un hueso sano, lo que quiere decir que un hueso en esta condición, es más propenso a una fractura como ya se había reportado previamente (18).

Se ha evidenciado que los huesos de ratones con ovariectomía en comparación con los huesos sanos el proceso de mineralización sucede de forma normal, sin embargo la reabsorción ocurre a una mayor velocidad (12), la cual no permite que exista un equilibrio entre ambos procesos, lo que dará como resultado la disminución del volumen en la cortical ósea, menor resistencia y una menor tolerancia a las cargas aplicadas y por lo tanto aumenta el riesgo de fractura (18).

Por lo que, nuestros resultados indican que el sistema construido tiene la capacidad de medir las propiedades mecánicas de huesos de ratones ovariectomizados, reflejo del incremento en la reabsorción ósea.

Finalmente, para ver la utilidad del sistema construido no solo en medir las propiedades mecánicas de muestras biológicas, también en materiales, realizamos replicas de huesos hechos con materiales de uso odontológico, se observó que los materiales que se usan directamente para realizar restauraciones directamente en boca, ofrecen un buen soporte a las cargas externas, sin embargo la resistencia que ofrece cada material es baja en comparación con los huesos analizados previamente.

El equipo confeccionado, no solo es útil para hacer pruebas biológicas, sino que también puede ser utilizado para la evaluación de materiales de uso médico.

Es importante comparar las medidas obtenidas en nuestro sistema con las medidas obtenidas con otros sistemas ya preexistentes como un equipo INSTRON.

CONCLUSIONES

Pudimos construir un dispositivo de flexión de tres puntos lo suficientemente sensible para detectar diferencias en las propiedades biomecánicas de huesos deshidratados, huesos con osteoporosis y capaz de determinar las propiedades mecánicas de otros materiales.

El sistema construido posee cualidades que lo convierten en una herramienta adecuada para el estudio de las propiedades biomecánicas y mecánicas de muestras pequeñas, debido a su fácil manejo, un tamaño amigable y una interfaz que no requiere un conocimiento especializado para ser manejada o comprender los resultados obtenidos, y nos permite hacer comparaciones de muestras control con muestras experimentales

Este sistema puede ser usado para el estudio de la biología ósea, la evaluación del riesgo de fractura ósea en modelos murinos en condiciones como en patologías genéticas que casuan deficiencia de la masa ósea, deficiecna de calcio o vitamina D, en la diabetes, sedentarismo, ejercicio, estimulación bioeléctrica, etc.

PERSPECTIVAS

Es importante continuar con la creación de sistemas de análisis de un manejo simple que permitan evaluar las propiedades biomecánicas no solo óseas, si no de diversos biomateriales. Ya que eso permitirá ampliar el conocimiento de cómo se ven afectadas las propiedades biomecánicas óseas en diversas patologías como en distintas condiciones.

Una vez elaborado un sistema de flexión de tres puntos, con un manejo sencillo y una interfaz amigable para el operador, se considera importante poder evaluar algunas otras propiedades que complementarían mejor los estudios, agregar aditamentos que permitan medir la deformación física del hueso, podría proporcionarnos mejores resultados al hacer una evaluación completa de las propiedades biomecánicas de la muestra.

Durante las pruebas de flexión, notamos que el uso de una placa Arduino puede facilitar muchas de las acciones durante la evaluación, es por eso que en un futuro sería bueno poder controlar no solo la interfaz de análisis, sino también el sistema de flexión propiamente dicho, lo que realmente lo convertiría en una herramienta accesible para el personal del área médica o cualquiera que quiera involucrarse en el estudio de las propiedades biomecánicas de materiales biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parfitt AM. Chapter 36 - Skeletal Heterogeneity and the Purposes of Bone Remodeling: Implications for the Understanding of Osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Dempster DW, Luckey M, Cauley JA, editors. *Osteoporosis (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 855-72.
2. Seeman E. From Density to Structure: Growing Up and Growing Old on the Surfaces of Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(4):509-21.
3. Kambiz F, Reza NM, A. JJ, C.G. LS. Interactions Between Inorganic and Organic Phases in Bone Tissue as a Source of Inspiration for Design of Novel Nanocomposites. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2014;20(2):173-88.
4. Ferraro V, Gaillard-Martinie B, Sayd T, Chambon C, Anton M, Santé-Lhoutellier V. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;97:55-66.
5. Kruger TE, Miller AH, Godwin AK, Wang J. Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014;89(2):330-41.
6. Lambert LJ, Challa AK, Niu A, Zhou L, Tucholski J, Johnson MS, et al. Increased trabecular bone and improved biomechanics in an osteocalcin-null rat model created by CRISPR/Cas9 technology. *Disease models & mechanisms*. 2016;9(10):1169-79.
7. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;1409(1):79-84.
8. Jepsen KJ, Silva MJ, Vashishth D, Guo XE, van der Meulen MCH. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2015;30(6):951-66.
9. Guede D, González P, Caeiro JR. Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2013;5:43-50.
10. Guede D1, González P3, Caeiro JR2,4. Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Osteoporos Metab Miner*. 2013.
11. Fonseca H, Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, HJ.A. et al. *Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility*. Springer International Publishing. 03 October 2013.
12. Heaney RP. Pathophysiology of Osteoporosis. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1996;312(6):251-6.
13. Lyles KW, Siris ES, Singer FR, Meunier PJ. GUÍAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET. *REEMO*. 2001;10(1):28-34.
14. Fukumoto S1 OK, Michigami T, Minagawa M, Okazaki R, Sugimoto T, Takeuchi Y, Matsumoto T. Pathogenesis and diagnostic criteria for rickets and osteomalacia - proposal by an expert panel supported by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, The Japanese Society for Bone and Mineral Research and The Japan Endocrine Society. *Japan Science and Technology Information Aggregator, Electronic*. 2015.
15. Varela A, Jollette J. Bone Toolbox: Biomarkers, Imaging Tools, Biomechanics, and Histomorphometry. *Toxicologic Pathology*. 2018;46(5):511-29.
16. Jiroušek Or. Nanoindentation of Human Trabecular Bone –Tissue Mechanical Properties Compared to Standard Engineering Test Methods. *Nanoindentation in Materials Science*. 2012.
17. Active Life Scientific, Inc. - Investigación Active Life Scientific, Inc. - Investigación Available from: <http://research.activelifescientific.com/osteoprobe/#Publications>.
18. Deckard C, Walker A, Hill BJF. Using three-point bending to evaluate tibia bone strength in ovariectomized young mice. *Journal of biological physics*. 2017;43(1):139-48.

19. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke H-J, Claes L, et al. Comparison between different methods for biomechanical assessment of ex vivo fracture callus stiffness in small animal bone healing studies. *PloS one*. 2015;10(3):e0119603-e.
20. Zhang C, Yang X, Gao H, Zhu H. Heterogeneous Fracture Simulation of Three-point Bending Plain-concrete Beam with Double Notches. *Acta Mechanica Solida Sinica*. 2016;29(3):232-44.
21. Salim MS, Salleh AF, Daud RJMWC. Bone Fracture Modeling and Analysis by Three Point Bending: A Review. 2016;77:11004.
22. TUTORIALES H. Sensor de Fuerza o Presión MF01 20018. Available from: <https://hetpro-store.com/TUTORIALES/sensor-de-fuerza-o-presion-mf01/>.
23. ARDUINO MEGA 2560 REV3. 2019.
24. Guede D, González P, Caeiro JR. Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos %J *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2013;5:43-50.
25. Doube M, Kłosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, Jackson JS, et al. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*. 2010;47(6):1076-9.
26. Wang X, Bank RA, Tekoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. 2001;19(6):1021-6.
27. Nyman JS, Roy A, Shen X, Acuna RL, Tyler JH, Wang X. The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. *Journal of biomechanics*. 2006;39(5):931-8.
28. ISO/TC106 Dentistry [Internet]. 2014.
29. Willingham MD BM, Lee KL, Stephens AL, Ye J, Silva MJ. Age-related changes in bone structure and strength in female and male BALB/c mice. . *Calcified tissue international*. 2010;86(6):470-83.
30. Group YG. INSTRON. Available from: <https://www.instron.us/en-us>.
31. Silva MJ. Bone Mechanical Testing by Three-Point Bending. 2016.
32. Meulen Vd. CONSIDERATIONS FOR MECHANICAL TESTING OF MOUSE LONG BONES. 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Program in Biomedical Mechanics, Cornell University, Ithaca NY2003.
33. Doz GN, Riera JD. Influence of support friction on three-point bend test. *International Journal of Pressure Vessels and Piping*. 1992;51(3):373-80.