

# Factores que influyen sobre los resultados de los ensayos de ultra-microindentación ósea. Un estudio experimental en ratas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000400005>

Ferreño D<sup>1</sup>, Pérez-Núñez I<sup>2</sup>, Grande Z<sup>3</sup>, Casado JA<sup>1</sup>, Diego S<sup>1</sup>, Carrascal IA<sup>1</sup>, Sánchez-Crespo M<sup>2</sup>, Pascual-Carra A<sup>2</sup>, De la Red-Gallego MA<sup>2</sup>, Riancho JA<sup>4</sup>

1 Laboratorio de la División de Ciencia e Ingeniería de los Materiales (LADICIM). Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Universidad de Cantabria. Santander (España)

2 Servicio de Traumatología y Ortopedia. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Universidad de Cantabria. Santander (España)

3 Core MKT Consulting. Ciudad Real (España)

4 Departamento de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Universidad de Cantabria. Santander (España)

Fecha de recepción: 07/12/2019 - Fecha de aceptación: 22/01/2020

Trabajo remitido como prestación de una beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2017

## Resumen

**Objetivo:** Las propiedades de los materiales que constituyen el tejido óseo son determinantes en su resistencia mecánica pero los factores que influyen sobre ella son parcialmente desconocidos en la actualidad.

**Material y métodos:** En esta investigación medimos la dureza ósea mediante ensayos de ultra-microindentación con punta tipo Berkovich y una carga de 150 mN en fémures de ratas Sprague-Dawley sometidas a una fractura transversal o a una osteotomía de sustracción, y comparamos los resultados en diferentes localizaciones óseas y grupos experimentales. El estudio comprende los siguientes cuatro grupos experimentales, cada uno de ellos constituido por cuatro ratas: a) fractura diafisiana estándar; b) fractura más osteotomía de 2 mm; c) osteotomía tratada con hormona paratiroidea humana, PTH (1-84); d) osteotomía tratada con ranelato de estroncio.

**Resultados:** Encontramos que la dureza del material era consistentemente mayor en el hueso cortical que en el hueso trabecular. También fue consistentemente más alto en las epífisis femorales superiores que en las epífisis inferiores (diferencia de 1,2 desviaciones estándar). La cirugía redujo la dureza en el fémur operado (diferencia de 0,3 desviaciones estándar,  $p=5,5 \times 10^{-2}$ ). El tratamiento con PTH indujo un aumento leve pero consistente de la dureza en todos los sitios ( $p=1,8 \times 10^{-5}$ ) mientras que el efecto del ranelato de estroncio fue inconsistente.

**Conclusiones:** Estos datos muestran que la microdureza tisular está influida por una variedad de factores, incluyendo la anatomía, el tipo de tejido óseo, la lesión esquelética y la terapia farmacológica. Por lo tanto, los estudios futuros sobre la calidad del tejido deberían diseñarse cuidadosamente teniendo en cuenta estos factores.

**Palabras clave:** calidad ósea, ultra-microindentación, dureza ósea.

## INTRODUCCIÓN

Las fracturas por fragilidad son el sello distintivo relevante de la osteoporosis<sup>1</sup>. El riesgo de fractura está estrechamente relacionado con la resistencia ósea que, a su vez, depende de la masa ósea, la geometría y la calidad del material<sup>2-6</sup>. La masa ósea y la geometría se pueden evaluar clínicamente mediante densitometría ósea y técnicas de imagen de alta resolución. Sin embargo, las propiedades mecánicas del tejido óseo son más difíciles de explorar. Estas propiedades determinan la calidad ósea, concepto que representa la capacidad intrínseca del tejido para resistir estados tensionales, independientemente de la cantidad de material (densidad ósea) o de

su distribución espacial (arquitectura ósea). La calidad ósea depende de la composición química y organización de la matriz ósea<sup>7</sup>.

En un ensayo de indentación o dureza, una muestra se somete a carga cuasi-estática por medio de un pequeño indentador, registrando el tamaño de la huella resultante; en ocasiones se determina también la curva que relaciona la carga aplicada y el desplazamiento experimentado por el indentador durante el ensayo. La dureza se define como la fuerza máxima aplicada dividida por el área de la huella que permanece en el material tras el ensayo. La dureza es la propiedad del material que caracteriza su resistencia frente a la deformación plástica/permanente<sup>8</sup>.



Correspondencia: Diego Ferreño (ferrenod@unican.es)

La ultra-microindentación (UMI) permite realizar ensayos de dureza a la escala trabecular, sobre trabéculas individuales y osteonas de hueso. Varios modelos preclínicos sugieren que los resultados pueden ser un marcador de la resistencia esquelética. Las principales ventajas de los ensayos con UMI son la simplicidad de la técnica y la capacidad de mapear la microdureza en diferentes zonas de una muestra<sup>8</sup>. Sin embargo, los factores que influyen en los resultados de dureza en el tejido óseo son solamente parcialmente conocidos, lo que limita la posibilidad de llevar a cabo comparaciones entre estudios. Este es un aspecto relevante, particularmente en vista de la reciente introducción de la técnica de ultra-microindentación en humanos<sup>9</sup>. En este sentido, el objetivo de este estudio fue el de explorar la variabilidad de la dureza en diferentes localizaciones esqueléticas, así como los cambios inducidos por diversas intervenciones en un modelo experimental.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Grupos de estudio.** Ratas Sprague-Dawley (13 semanas de edad) habían sido empleadas como parte de un estudio de retraso en la consolidación de fractura femoral, utilizando un tornillo intramedular retrógrado insertado a través de la región intercondílea de la rodilla para la fijación. Los detalles se han publicado previamente<sup>10</sup>. Los grupos de estudio (4 ratas cada uno) incluyeron: a) fractura diafisaria transversa; b) fractura más osteotomía de sustracción diafisaria de 2 mm (SO); c) SO tratada con hormona paratiroidea humana, PTH (1-84) (30 mcg/kg/día vía subcutánea); d) SO tratado con ranelato de estroncio (SR) (900 mg/kg/día vía oral). Doce semanas después de la cirugía, los animales fueron sacrificados, se extrajeron ambos fémures y se conservaron a -18°C hasta que se analizaron.

**Ensayos de dureza.** La epífisis superior e inferior de los fémures no operados, así como la epífisis superior de los fémures operados, fueron cuidadosamente seccionadas y embutidas en resina acrílica. Las epífisis inferiores de los fémures operados no pudieron ser analizadas debido a las alteraciones inducidas por la inserción del tornillo. Las secciones transversales fueron pulidas con papel de carburo de silicio y posteriormente con óxido de aluminio con un tamaño de partícula decreciente hasta 0,05 mm. Antes del ensayo, las muestras se sumergieron en una solución *buffer* de fosfato cálcico a 37°C, para imitar las condiciones fisiológicas. La dureza se analizó en 12-15 puntos seleccionados al azar de las regiones corticales y trabeculares, mediante el uso de un ultra-microindentador Shimadzu DUH 211 con una punta Berkovich fabricada en diamante. Los parámetros del ensayo fueron los siguientes: velocidad de carga, 2.665 mN/s; carga máxima ( $P_{max}$ ), 150 mN; tiempo de mantenimiento de la carga, 10 s; velocidad de descarga, 2.665 mN/s. Después de la descarga, el área de la huella residual ( $A_r$ ) se midió con un microscopio óptico y la dureza del material se estimó como  $P_{max}/A_r$ .

**Análisis de datos.** Los datos del estudio se distribuyeron en grupos de acuerdo con las variables independientes (tejido trabecular o cortical, epífisis superior o inferior, fémur operado o no operado, tipo de cirugía y terapia farmacológica). Los datos de UMI de cada grupo fueron sometidos a una prueba de bondad de ajuste  $\chi^2$  para confirmar que eran homogéneos y que seguían una distribución normal. Sólo los grupos con  $p > 0,95$  se con-

sideraron utilizables a los efectos del presente análisis. Se utilizó una prueba t sin emparejar de dos colas para las comparaciones por pares y se calculó un valor p con corrección de Bonferroni. A continuación, se estimó la diferencia global entre conjuntos de muestras que eran similares salvo por una única variable predictora distintiva para evaluar su influencia. Para ello se calculó la *g* de Hedge, que es equivalente a la diferencia entre grupos expresada en *Z-score*. Se utilizaron modelos de efectos aleatorios para estos cálculos, implementados en el programa Meta-Essentials ([www.eriim.eur.nl/research-facilities/meta-essentials](http://www.eriim.eur.nl/research-facilities/meta-essentials)).

## RESULTADOS

En la tabla 1 se resumen las condiciones y los resultados obtenidos (la media y la desviación estándar de dureza) para cada uno de los 32 grupos experimentales. La última columna ('Analizable') indica el resultado de la prueba de bondad del ajuste  $\chi^2$ ; debe tenerse en cuenta que sólo cuatro grupos resultaron no analizables. Los valores *g* de las comparaciones entre grupos se representan en la figura 1.

En cuanto a la variabilidad regional, la dureza del material fue consistentemente mayor en el hueso cortical que en el hueso trabecular, con una diferencia promedio de aproximadamente 0,6 desviaciones estándar ( $p=8,0 \times 10^{-4}$ , figura 1A). Del mismo modo, la dureza fue consistentemente mayor en las epífisis femorales superiores que en las epífisis inferiores (diferencia estándar 1,2 unidades,  $p=5 \times 10^{-5}$ , figura 1C).

El posible impacto de la intervención quirúrgica a nivel regional se exploró comparando la dureza en los fémures operados y no operados. Como se muestra en la figura 1B, hubo una tendencia no significativa para la disminución de la dureza en el fémur operado (diferencia de 0,3 desviaciones estándar,  $p=5,5 \times 10^{-2}$ ). La fractura estándar sólo pudo ser comparada con la SO en tres grupos. Este último procedimiento tendía a asociarse con una dureza más baja ( $p=3,7 \times 10^{-2}$ , figura 1D).

El efecto de la PTH se exploró en cinco parejas de grupos. El fármaco indujo un aumento leve pero consistente en la dureza en todos los sitios ( $p=1,8 \times 10^{-5}$ , figura 1E). Sin embargo, el efecto del SR fue inconsistente ( $p=3,0 \times 10^{-1}$ , figura 1F).

## DISCUSIÓN

Desde la perspectiva clínica, la masa ósea evaluada por DXA es el predictor más utilizado de la capacidad del hueso para resistir las cargas repetitivas de la vida diaria y otros impactos ocasionales. Sin embargo, desde un punto de vista mecánico, la arquitectura ósea (la distribución de la masa ósea) y la calidad (es decir, las propiedades materiales intrínsecas del tejido), son los determinantes relevantes de la resistencia ósea global.

Las técnicas avanzadas de diagnóstico por imágenes, como la tomografía computarizada (TC) de alta resolución y la resonancia magnética nuclear (RMN), pueden proporcionar información útil sobre la geometría ósea, la porosidad cortical y la microarquitectura trabecular. Sin embargo, la calidad ósea sigue siendo un concepto un tanto esquivo, porque los determinantes bioquímicos y celulares se conocen incompletamente y no son fáciles de medir. No obstante, la dureza ósea (que expresa la resistencia a la deformación plástica) se utiliza con frecuencia como un marcador de la calidad del tejido. En este sentido, la determinación de la dureza está emergiendo

**Tabla1. Grupos experimentales y valores de dureza**

Grupo	Tejido	Epífisis	Intervención	Operado	Fármaco	N <sub>tests</sub>	H <sub>mean</sub> (kp/mm <sup>2</sup> )	DE (kp/m)	Analizable
1	Cortical	Sup.	Fractura	Sí	No	52	64,0	12,7	No
2	Cortical	Sup.	SO	Sí	No	48	58,2	6,4	Sí
3	Cortical	Sup.	SO	Sí	PTH	50	62,0	8,1	Sí
4	Cortical	Sup.	SO	Sí	SR	57	67,9	8,9	No
5	Cortical	Sup.	Fractura	No	No	54	60,9	10,0	No
6	Cortical	Sup.	SO	No	No	48	63,1	11,7	Sí
7	Cortical	Sup.	SO	No	PTH	54	65,3	7,2	Sí
8	Cortical	Sup.	SO	No	SR	56	58,5	9,1	Sí
13	Cortical	Inf.	Fractura	No	No	53	52,0	6,9	Sí
14	Cortical	Inf.	SO	No	No	50	49,1	6,2	Sí
15	Cortical	Inf.	SO	No	PTH	49	50,4	5,4	Sí
16	Cortical	Inf.	SO	No	SR	58	53,3	5,6	Sí
17	Trabecular	Sup.	Fractura	Sí	No	53	57,5	7,7	Sí
18	Trabecular	Sup.	SO	Sí	No	53	52,5	6,4	Sí
19	Trabecular	Sup.	SO	Sí	PTH	53	53,3	5,4	Sí
20	Trabecular	Sup.	SO	Sí	SR	57	57,3	5,9	Sí
21	Trabecular	Sup.	Fractura	No	No	51	56,3	5,0	Sí
22	Trabecular	Sup.	SO	No	No	54	56,0	6,6	Sí
23	Trabecular	Sup.	SO	No	PTH	57	57,7	6,0	Sí
24	Trabecular	Inf.	SO	No	SR	57	56,3	5,6	Sí
29	Trabecular	Inf.	Fractura	No	No	51	50,3	7,4	Sí
30	Trabecular	Inf.	SO	No	No	53	52,1	6,4	No
31	Trabecular	Inf.	SO	No	PTH	50	48,7	5,6	Sí
32	Trabecular	Inf.	SO	No	SR	55	54,3	7,1	Sí

H<sub>mean</sub>: media; DE: desviación estándar; Sup.: superior; Inf.: inferior; SR: ranelato de estroncio.

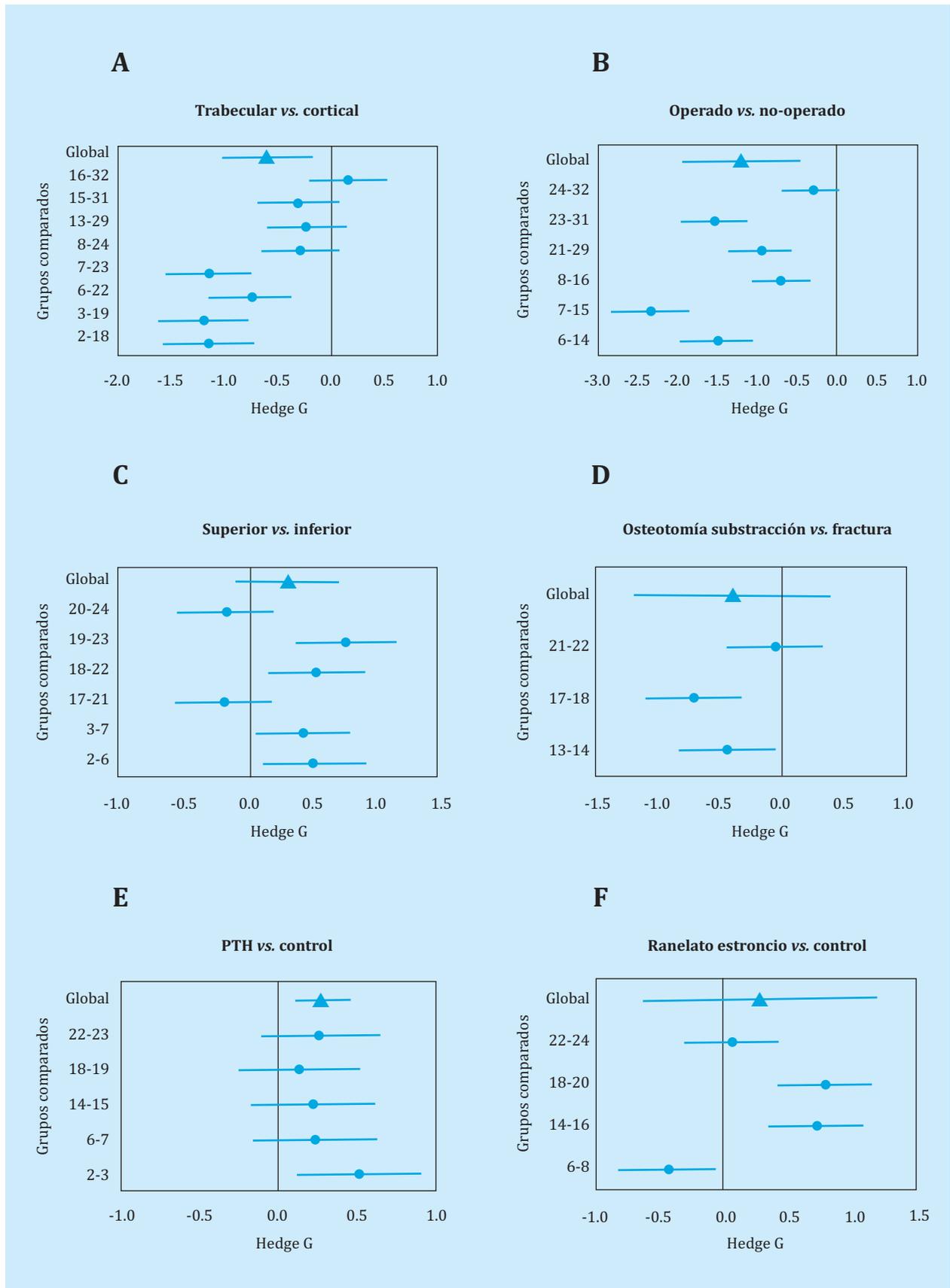
como una técnica que proporciona información útil en estudios clínicos<sup>11</sup>. Los ensayos de ultra-microindentación permiten obtener otros parámetros de interés, además de la dureza, para caracterizar el comportamiento mecánico del tejido óseo, en particular el módulo elástico de Young del material. Sin embargo, la evidencia disponible demuestra que la definición de los parámetros de ensayo puede jugar un papel relevante en los resultados obtenidos. En el trabajo de Zhang *et al.*<sup>12</sup> se comparan los valores obtenidos para la dureza y para el módulo de Young en huesos a partir de ensayos de nanoindentación y microindentación. De acuerdo con estos autores, mientras que la dureza es un parámetro estable frente a los valores de carga, el módulo de Young se reduce notablemente al incrementar el valor de carga. Por este motivo, la dureza resulta preferible a la hora de llevar a cabo comparaciones con otros estudios.

Debido a cuestiones prácticas y éticas, la dureza generalmente se determina en un solo punto óseo. Sin embargo, existe poca información sobre las diferencias en la dureza evaluada en diferentes regiones esqueléticas y sobre la influencia de enfermedades y terapias farmacológicas. Por lo tanto, aprovechamos un estudio de fractura en ratas para tratar de proporcionar información adicional en este importante campo de investigación. Nuestros datos muestran claramente que la dureza es consistentemente mayor en el hueso cortical que en el hueso trabecular. Del mismo modo, es diferente a través de huesos individuales, y específicamente, es mayor en

las epífisis femorales superiores que en las inferiores. Por otro lado, la fractura inducida tiende a disminuir la dureza en el hueso fracturado, mientras que la PTH aumenta la dureza en todas las regiones analizadas.

Dado que los determinantes de la dureza ósea no se han aclarado completamente, los mecanismos subyacentes a esas diferencias siguen siendo desconocidos. Sin embargo, no resulta aventurado especular que deben estar relacionados con la composición de la matriz y, específicamente, con sus principales componentes orgánicos e inorgánicos, a saber, colágeno e hidroxiapatita. De hecho, los determinantes sugeridos del comportamiento mecánico del tejido óseo incluyen: orientación del colágeno, perfil de reticulación de colágeno, grado de mineralización o relación mineral-matriz, agua enlazada y estructura mineral (incluyendo el tamaño de los cristales de hidroxiapatita)<sup>13</sup>. La orientación de la fibra de colágeno puede ser uno de los factores responsables de las diferencias observadas entre la dureza del hueso trabecular y del cortical. Asimismo, las diferentes tasas de remodelado pueden desempeñar un papel; así, el aumento de la edad del tejido se asocia con una mayor microdureza, tal vez debido a una mayor mineralización<sup>14</sup>. Del mismo modo, los cambios en la remodelación ósea inducidos por una lesión pueden ayudar a explicar las diferencias que encontramos entre el fémur operado y el no operado. La carga mecánica tiene un conocido efecto anabólico sobre el hueso. Por lo tanto, el aumento de la carga se asocia generalmente con el aumento de la masa ósea, mientras que la descarga causa una pérdida rápida de densidad ósea.

**Figura 1.** Resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de UMI. Valores g de Hedge de las diferentes comparaciones entre grupos. Se muestran el valor medio (similar a la diferencia media estandarizada) y el intervalo de confianza del 95% de cada comparación (círculos). También se incluyen el valor global y su intervalo de confianza (triángulos). Los números en el eje izquierdo identifican los grupos comparados, como se designan en la tabla 1



Es menos conocido que la estimulación mecánica puede causar cambios en la calidad en el hueso<sup>7</sup>. Aunque la relevancia real de tal efecto todavía no está clara, también puede ayudar a explicar las diferencias que hemos observado entre las regiones esqueléticas y entre los grupos sometidos a diversas intervenciones. En particular, el menor apoyo de la extremidad intervenida, y consecuentemente el sometimiento a una menor carga mecánica, puede contribuir a explicar la menor dureza observada en los fémures fracturados.

La administración intermitente de PTH o moléculas relacionadas que activan el receptor PTH, como teriparatida o abaloparatida, disminuye el riesgo de fractura. El efecto de la PTH en la dureza del tejido es controvertido. Brennan *et al.*<sup>15</sup> y Amugongo *et al.*<sup>16</sup> reportaron ausencia de cambios en la microdureza en ratas ovariectomizadas tratadas con teriparatida. Por otro lado, Mellibovsky *et al.* señalaron que la teriparatida mejoró las propiedades del material en pacientes con osteoporosis inducida por glucocorticoides<sup>11</sup>. En este estudio encontramos un pequeño pero significativo efecto de la PTH en la dureza del tejido, probablemente relacionado con los cambios inducidos por la PTH en la remodelación ósea<sup>17,18</sup>.

Es interesante señalar que, aunque las proteínas diferentes del colágeno representan sólo una pequeña fracción de la matriz ósea, en torno al 10%, parecen importantes para determinar la dureza y resistencia del hueso. Por un lado,

contribuyen a regular la mineralización; por otro, crean enlaces con las fibras colágenas que ayudan a absorber y disipar energía a nivel nano-estructural<sup>19</sup>. Ciertamente, algunos tratamientos pueden inducir cambios en la expresión de los genes que codifican estas proteínas, así como en la cuantía y distribución espacial de los cristales de hidroxapatita, constituyendo así otro mecanismo por el que influir en las propiedades mecánicas de la matriz ósea.

En resumen, aunque la composición tisular y la microestructura son probablemente factores importantes de la resistencia del tejido, las propiedades materiales también contribuyen a la resistencia ósea. Nuestro estudio muestra que la microdureza tisular está influida por una variedad de factores, incluyendo la anatomía, el tipo de tejido óseo, la lesión esquelética y la terapia farmacológica. Por lo tanto, los estudios futuros sobre la calidad del tejido deberían diseñarse cuidadosamente teniendo en cuenta esos factores.

**Agradecimientos:** Este estudio fue apoyado parcialmente por becas de investigación del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, Nycomed y Servier.

**Declaración ética:** Este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Universidad de Cantabria y de conformidad con la Directiva 2010/63/UE de la UE <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>.

 **Conflicto de intereses:** JAR ha recibido ayudas para proyectos de investigación, bolsas de viaje u honorarios por conferencias de Amgen, Lilly y MSD. El resto de autores no tienen conflictos de intereses relevantes.

## Bibliografía

1. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011;377:1276-87.
2. Ritchie RO. How does human bone resist fracture? *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1192:72-80.
3. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int*. 2003;14 (suppl):S13-8.
4. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano H, Duarte J. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sport Med*. 2014;44:37-53.
5. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Nature*. 1998; 20:92-102.
6. Gupta HS, Zioupos P. Fracture of bone tissue: The "hows" and the "whys". *Med Eng Phys*. 2008;30:1209-26.
7. Berman AG, Wallace JM. Bone quality and quantity are mediated by mechanical stimuli. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2016;14:218-26.
8. Hunt HB, Donnelly E. Bone quality assessment techniques: geometric, compositional, and mechanical characterization from macroscale to nanoscale. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2016;14:133-49.
9. Guerri-Fernandez RC, Nogue X, Quesada Gomez JM, Torres DP, Puig L, Garcia-Giralt N, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue material properties in atypical femoral fracture patients and controls. *J Bone Miner Res*. 2013;28:162-8.
10. Pérez Núñez MI, Ferreño Blanco D, Alfonso Fernández A, Casado del Prado JA, Sánchez Crespo M, de la Red Gallego M, et al. Comparative study of the effect of PTH (1-84) and strontium ranelate in an experimental model of atrophic nonunion. *Injury*. 2015;46: 2359-67.
11. Mellibovsky L, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky F, Güerri-Fernández R, Nogués X, Randall C, et al. Bone tissue properties measurement by reference point indentation in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2015;30:1651-6.
12. Zhang J, Niebur GL, Ovaert TC. Mechanical property determination of bone through nano- and micro-indentation testing and finite element simulation. *J Biomech*. 2008;41:267-75.
13. Unal M, Creecy A, Nyman JS. The Role of matrix composition in the mechanical behavior of bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16:205-15.
14. Donnelly E, Boskey A, Baker S, van der Meulen M. Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92:1048-56.
15. Brennan TC, Rizzoli R, Ammann P. Selective modification of bone quality by PTH, pamidronate, or raloxifene. *J Bone Miner Res*. 2009;24:800-8.
16. S. Amugongo S, Yao W, Jia J, Dai W, Lay Y, Jiang L, et al. Effect of sequential treatments with alendronate, parathyroid hormone (1-34) and raloxifene on cortical bone mass and strength in ovariectomized rat. *Bone*. 2014;67:257-68.
17. Burr DB. Bone biomechanics and bone quality: effects of pharmaceutical agents used to treat osteoporosis. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2016;14:197-217.
18. Imbert L, Boskey A. Effects of drugs on bone quality. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2016;14:167-96.
19. Gardinier J, Al-Omaishi S, Rostami N, Morris M, Kohn D. Examining the influence of PTH(1-34) on tissue strength and composition. *Bone*. 2018;117:130.7.