

Estudio de hueso trabecular mediante espectrometría infrarroja

M. Rada^a, F. Rodríguez^a, J. Soto^a, L. Buelta^a, O. Díaz Arado^b, O. Díaz Rizo^{b†}

a) Departamento de Física Médica, Universidad de Cantabria, Santander, España

b) Departamento de Física Nuclear, Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, La Habana, Cuba; odrizo@instec.cu.

† Autor para la correspondencia

Recibido el 15/12/07. Aprobado en versión final el 15/06/2008.

Sumario. Se presenta el estudio de piezas óseas de hueso de un sujeto sano procedentes de biopsias de cresta iliaca mediante la técnica de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier. Del análisis de las bandas espectrales correspondientes a los modos normales ν_1 y ν_3 del fosfato y ν_2 del carbonato se han determinado el índice de cristalinidad/madurez, la proporción entre las sustituciones de carbonato en la red de HA tipo A y tipo B y el contenido relativo de carbonato. El mayor valor del índice de cristalinidad/madurez se encuentra en el centro de la trabécula, lugar en el que sólo aparece el pico de absorción correspondiente a sustitución de carbonato tipo A y dónde se obtiene el mayor contenido relativo de carbonato. Los resultados obtenidos indican que la madurez mineral disminuye desde el centro trabecular hacia los bordes de la trabécula.

Abstract. A study of bone samples from a healthy subject obtained by iliac crest biopsies analyzed with FT-IR is presented. From the analysis of the spectral bands corresponding to the ν_1 and ν_3 phosphate vibration modes and the carbonate ν_2 are determined the cristallinity/maturity index, the carbonate substitutions (type A and B) ratio on the HA net and the relative amount of carbonate in the sample. The largest value of the cristallinity/maturity index is found in the middle of the trabecula, place where only appears the carbonate absorption maximum corresponding to a type A substitution, and where the largest relative amount of carbonate is obtained as well. The results show the mineral maturity vanishes from the middle of the trabecula into its edges.

Palabras clave. Infrared spectroscopy 87.64.Je, Bone 87.58.Xs, Minerals 91.67.Pq

1 Introducción

El hueso es un material compuesto formado por materia orgánica, fundamentalmente colágeno tipo I, y materia mineral. Las moléculas de colágeno presentes en la materia orgánica se estructuran formando microfibrillas que se unen entre si formando fibras de mayor tamaño. Esta estructura fibrilar se complementa con el depósito de pequeños cristales de hidroxiapatita (HA), que constituyen la componente mineral¹. La combinación de materia mineral y orgánica dota al hueso de las propiedades elás-

ticas más idóneas para su función biológica de soporte, confiriéndole buena rigidez y resistencia a la rotura².

Desde el punto de vista mecánico el hueso posee una estructura formada por una corteza externa, conocida como hueso cortical, y un espacio interior esponjoso constituido por hueso trabecular y médula ósea. Tanto el hueso cortical como el trabecular se encuentran en constante renovación con eliminación de hueso viejo y/o lesionado y sustitución por hueso nuevo. Este proceso se denomina remodelado óseo y se produce por la acción combinada de los osteoclastos y osteoblastos, células

óseas encargadas de reabsorber y generar hueso respectivamente³.

La red cristalina de HA que constituye la componente mineral sufre continuamente sustituciones iónicas. El número y tipo de sustituciones varían con la edad del mineral, modificando por tanto la estequiometría. Entre las sustituciones existentes son importantes las del ión carbonato CO_3^{2-} , que puede ocupar distintos lugares dentro de la red de HA, dando lugar a apatita carbonatada no estequiométrica, sustituyendo al grupo hidroxilo OH^- (tipo A) o al ión fosfato PO_4^{3-} (tipo B). El tamaño de los cristales de HA aumenta a medida que el mineral es más maduro, lo que contribuye a modificar las propiedades mecánicas de hueso.

En este trabajo se estudia la componente mineral de hueso trabecular de cresta iliaca humana mediante microespectroscopía FT-IR. El estudio se centra en el análisis de las bandas de absorción, aún no reportadas en la literatura, correspondientes al grupo fosfato presente en la HA y al ión carbonato que sustituye a los aniones en la red cristalina. El estudio de las bandas espectrales obtenidas mediante esta técnica debe permitir identificar los distintos componentes del hueso, cuantificar la proporción en que se encuentran en éste y determinar diferencias en las distintas posiciones anatómicas.

2 Materiales y métodos

Se han utilizado piezas de hueso sano procedentes de biopsia de cresta iliaca⁴, realizada en un paciente de 62 años. Las piezas óseas fueron sometidas previamente a un estudio histológico en el que se determinaron los parámetros estáticos primarios y secundarios del hueso (volumen trabecular, volumen de osteoide, superficie relativa de formación, superficie osteoblástica activa, superficie relativa de osteoide con osteoblastos cúbicos, superficie relativa de reabsorción, superficie relativa de reabsorción activa, superficie específica de hueso trabecular, índice osteoclástico, anchura media de los ribetes trabeculares del osteoide, espesor medio de los ribetes de osteoide e índice de espesor trabecular). Los resultados obtenidos se compararon con los valores promedio característicos de edad adulta, indicando la existencia de un nivel importante de formación ósea a la vez que una actividad grande de las células destructoras de hueso aunque se observa poca destrucción ósea.

Las muestras de hueso fueron fijadas con alcohol, embebidas en metil metacrilato (PMMA) y cortadas en secciones sucesivas de 6 μm de espesor utilizando un micrótopo modelo Reichert-Jung. Cada sección se colocó sobre un disco de KBr, transparente a la radiación infrarroja en el rango de interés (1200-600 cm^{-1}). Los discos se prepararon presionando 200 mg de polvo desecado de bromuro potásico con un troquel para obtener un disco transparente.

Una vez dispuestas sobre los discos, se intentó eliminar el PMMA de las muestras utilizando metil acetato⁵. Mediante esta técnica no fue posible eliminar por com-

pleto el medio embebedor, quedando siempre restos en la muestra distribuidos de forma más heterogénea que al comienzo del proceso de lavado y produciendo un cierto deterioro de la matriz ósea. Considerando este hecho, se decidió medir las muestras preparadas con el medio embebedor íntegro y proceder después a la substracción de su contribución espectral.

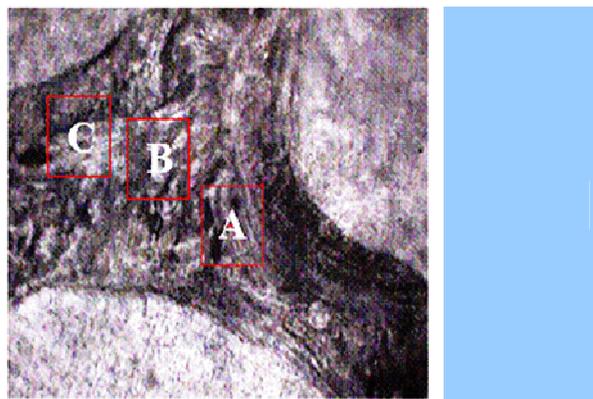


Figura 1. Regiones analizadas por FT-IR en hueso trabecular.

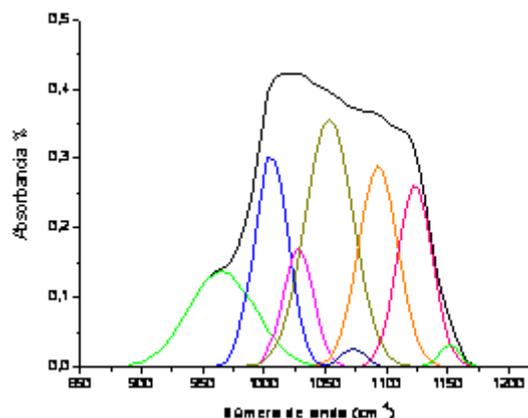


Figura 2a. Ajuste de la banda del fosfato correspondiente a la región A.

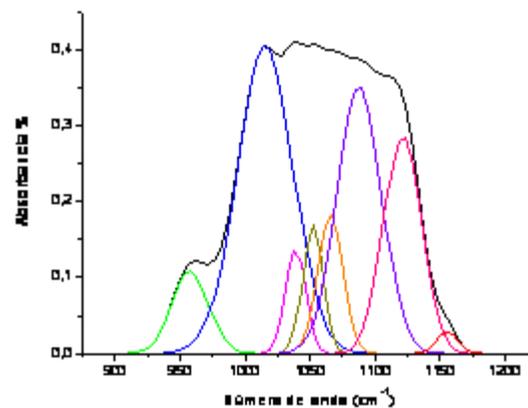


Figura 2b. Ajuste de la banda del fosfato correspondiente a la región B.

Una vez preparadas, las muestras fueron medidas en el modo transmisión mediante un espectrómetro de simple haz Nicolet cuyo rango de medida abarca desde

11000 hasta 375 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . El espectrómetro dispone de un microscopio Nicolet Continuum que permite seleccionar la zona de la muestra que desea analizarse. Se hicieron medidas a 240 scans en tres regiones distintas de hueso trabecular, denotadas A, B y C, de aproximadamente $50 \times 50\ \mu\text{m}$ cada una. Las regiones seleccionadas se muestran en la figura 1. Se midió también una región de PMMA, sin hueso, para poder restar posteriormente su contribución espectral.

En los tres espectros correspondientes a las regiones A, B y C, aparecen bandas características del PMMA en la región de interés. Dichas bandas solapan con aquellas correspondientes a las componentes mineral y orgánica óseas, dificultando el análisis cualitativo y cuantitativo de las últimas. Con el fin de eliminar la contribución espectral del medio embebedor, se corrigieron las líneas base todos los espectros y se restó el espectro de PMMA a los correspondientes a las regiones A, B y C. Para la resta se utilizó como factor de escala la intensidad del pico característico del PMMA que aparece a 1725 cm^{-1} en cada uno de los espectros de hueso trabecular y que no solapa con ninguna banda característica de hueso⁶.

3 Resultados y discusión

En los espectros resultantes pueden identificarse, las siguientes bandas de absorción en el rango de interés:

- $850\text{-}890\text{ cm}^{-1}$ corresponde al modo vibracional ν_2 del ión carbonato que sustituye a los aniones fosfato y/o hidroxilo en la red de hidroxiapatita.
- $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los modos ν_1 y ν_3 del ión fosfato presente en la hidroxiapatita.
- $1350\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ y $1585\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$ corresponden respectivamente a la amida II y amida I. Aparece además una banda en torno a 1600 cm^{-1} característica del agua que interfiere con las anteriores, debida a la humedad absorbida por los discos de KBr⁷.
- Por último se observa una banda de absorción de gran intensidad entorno a 2350 cm^{-1} correspondiente al CO_2 presente en el ambiente.

A partir de la banda correspondiente a los modos de vibración ν_1 y ν_3 del fosfato puede determinarse el índice de cristalinidad/madurez⁸, definido como el cociente entre las áreas de las subbandas situadas en 1020 y 1030 cm^{-1} . Mediante el análisis de la banda correspondiente al modo vibracional ν_2 del carbonato puede determinarse la importancia relativa de las sustituciones tipo A y B. Por último, puede obtenerse el contenido relativo de carbonato en la red mineral haciendo el cociente entre las áreas de la banda ν_1 y ν_3 del fosfato y la correspondiente a ν_2 del carbonato.

Para determinar los picos que forman las bandas correspondientes a los modos ν_1 y ν_3 del fosfato y ν_2 del carbonato, se calculó la derivada segunda de espectro con el fin de determinar las frecuencias características de dichos picos. Estas frecuencias se utilizaron después para hacer el ajuste de cada una de las bandas mediante un

programa de análisis espectral cuya salida proporciona las características de cada pico (área, intensidad, anchura a media altura).

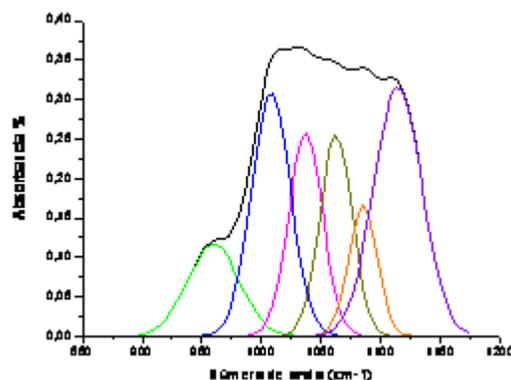


Figura 2c. Ajuste de la banda del fosfato correspondiente a la región C.

Picos de absorción encontrados en la banda ν_1 , ν_3 del ión fosfato	
ν (cm^{-1})	
1151,1156	Sobretono armónico o banda de combinación
1121,1115	Presencia de fosfato no apatítico
1091,1088,1085	Modo de tensión asimétrico triplemente degenerado, ν_{3a} , de PO_4^{3-} en HA
1072,1065	Presencia de HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} , HA no estequiométrica.
1052,1062	Modo de tensión asimétrico triplemente degenerado, ν_{3b} , de PO_4^{3-} en HA
1028,1038,1037	Modo de tensión asimétrico triplemente degenerado, ν_{3c} , de PO_4^{3-} en HA
1003,1015,1008	Presencia de HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} , HA no estequiométrica.
964,955,960	Modo de tensión simétrico no degenerado, ν_1 , de PO_4^{3-} en HA

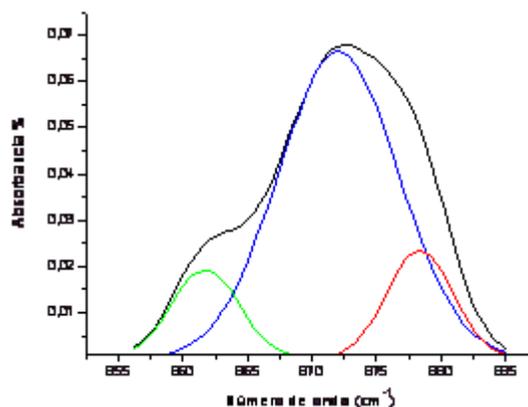


Figura 3a. Ajuste de la banda del carbonato correspondiente a la región A.

El ajuste de la banda del fosfato correspondiente a las

regiones A, B y C se muestra en las Figuras 2a, 2b y 2c respectivamente. Las frecuencias de los picos obtenidos en el ajuste así como su identificación se muestran en la Tabla I.

En las tres regiones aparecen los picos de absorción correspondientes a los modos normales ν_1 y ν_3 del fosfato en la red de hidroxiapatita. El pico de absorción correspondiente al modo ν_1 de tensión simétrico no degenerado aparece a 964, 958 y 960 cm^{-1} en las regiones A, B, y C respectivamente.

Los picos de absorción correspondientes al modo ν_3 de tensión asimétrico triplemente degenerado aparecen a 1091, 1052 y 1028 cm^{-1} en la región A, 1039, 1052 y 1088 cm^{-1} en la región B, y 1037, 1062 y 1085 cm^{-1} en la región C. En las regiones A y B aparece además un pico de absorción a aproximadamente 1150 cm^{-1} correspondiente a un sobretono armónico. Por último, en las tres regiones se encuentran picos de absorción con frecuencias características próximas a 1120 y 1010 cm^{-1} , indicativos de la presencia de hidroxiapatita no estequiométrica, con sustituciones iónicas de HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} .

El ajuste de la banda del carbonato correspondiente a las regiones A, B y C se muestra en las figuras 3a, 3b y 3c respectivamente. Las frecuencias de los picos obtenidos en el ajuste así como su identificación se muestran en la Tabla II.

El pico de absorción más intenso aparece a 872, 870 y 872 cm^{-1} en las regiones A, B y C respectivamente. Este pico representa al carbonato tipo B en la red de hidroxiapatita. En las regiones A y C aparece además otro pico de absorción de menor intensidad a 878 y 879 cm^{-1} respectivamente, que representa al carbonato tipo A en la hidroxiapatita. Finalmente, en la región A aparece un tercer pico poco intenso a 862 cm^{-1} correspondientes a carbonato inestable.

Las diferencias encontradas en las frecuencias características de los modos vibracionales en las distintas regiones pueden justificarse por la influencia del entorno, que presenta distinto número y tipo de sustituciones iónicas.

A partir de las áreas de los picos de absorción de la banda del fosfato proporcionadas por el programa de ajuste, se calculó el índice de cristalinidad/madurez. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. El mayor valor del índice se obtiene en la región B del hueso trabecular, donde toma un valor de 2.2 frente a 2.0 y 1.4 en las regiones A y C respectivamente. Por lo tanto, el mineral más maduro se encuentra en la región central de la trabécula y su madurez va disminuyendo a medida que nos aproximamos al borde. Este resultado es coherente con el hecho de que el proceso de remodelación ósea se establece en la superficie trabecular.

Con el fin de determinar la sustitución predominante del ión carbonato se calculó el cociente de intensidades de los picos a 870 y 878 cm^{-1} . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. En todos los casos se encuentra que la sustitución tipo B es más abundante que la de tipo A. El tipo de sustitución predominante da información sobre la madurez cristalina⁹.

En las primeras etapas del hueso, predominan la sustitución de HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} que ocupan el lugar del ión PO_4^{3-} en la red de HA.

Con la madurez disminuye la concentración de HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} y aumenta la sustitución de tipo A.

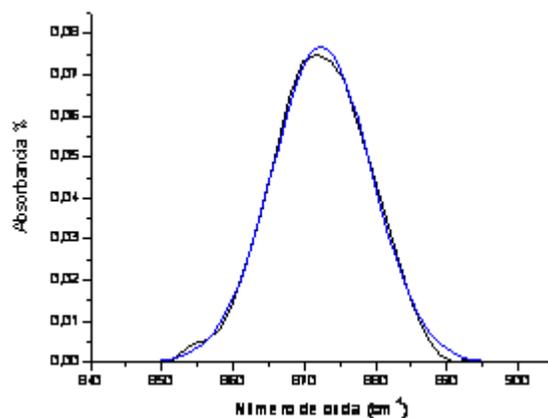


Figura 3b. Ajuste de la banda del carbonato correspondiente a la región B.

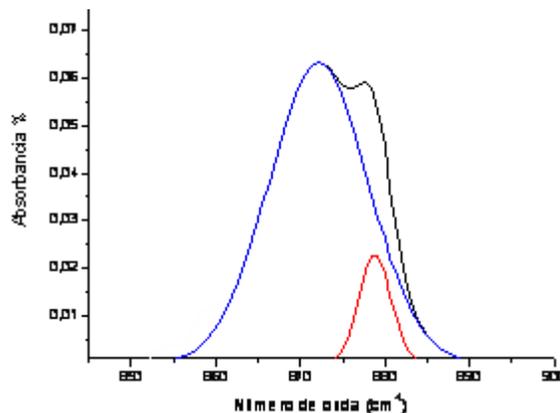


Figura 3c. Ajuste de la banda del carbonato correspondiente a la región C.

ν (cm^{-1}) Región A	ν (cm^{-1}) Región B	ν (cm^{-1}) Región C	
862	-	-	CO_3^{2-} inestable
872	870	872	CO_3^{2-} sustituyendo al PO_4^{3-} en HA (Tipo B)
878	-	879	CO_3^{2-} sustituyendo al OH^- en HA (Tipo A)

Considerando esto y en base a los resultados obtenidos, el mineral con mayor madurez se encuentra en la región B, en la cual sólo aparece el pico de absorción correspondiente al carbonato tipo B. En las regiones A y C la contribución de carbonato tipo A es similar, siempre inferior a la correspondiente al tipo B. Este resultado es coherente con la información aportada por el índice de cristalinidad/ madurez¹⁰. De nuevo la zona más madura

se encuentra en la región B, pero en los tres casos la sustitución de tipo B es claramente predominante, indicando que se trata de mineral maduro.

Por último se calculó el cociente entre las áreas de las bandas del fosfato y el carbonato, que da idea de la proporción existente de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. De nuevo, el mayor contenido de carbonato se obtiene en la región B, que contiene el mineral de mayor madurez.

Región	1020/1030	878/872	fosfato/carbonato
A	2.0	0.35	0.016
B	2.2	-	0.021
C	1.4	0.36	0.018

4 Conclusiones

El estudio de las bandas espectrales obtenidas mediante FT-IR permite identificar los distintos componentes del hueso sano, cuantificar la proporción en que se encuentran en éste y determinar diferencias en las distintas posiciones anatómicas

Se ha estudiado la absorción infrarroja en distintos puntos del hueso trabecular de un paciente sano. A partir del análisis de las bandas espectrales correspondientes a los modos normales ν_1 y ν_3 del fosfato y ν_2 del carbonato se ha determinado el índice de cristalinidad/madurez, la proporción entre las sustituciones de carbonato en la red de HA tipo A y tipo B y el contenido relativo de carbonato. El mayor valor del índice de cristalinidad/madurez se encuentra en el centro de la trabécula, lugar en el que sólo aparece el pico de absorción correspondiente a sustitución de carbonato tipo A y dónde se obtiene el mayor contenido relativo de carbonato.

Estos resultados indican que el mineral más maduro se encuentra en el centro de la trabécula. El valor del índice cristalinidad/madurez, así como el contenido relativo de carbonato, disminuyen hacia los bordes de la trabécula. A medida que se consideran regiones más alejadas del centro, aparecen además los picos de absorción

correspondientes a hidroxiapatita carbonatada tipo B, aunque la sustitución predominante continúa siendo la de tipo A. Por tanto, la madurez del mineral va disminuyendo hacia los bordes de la trabécula. Estos resultados son coherentes con el hecho de que el proceso de remodelación ósea se lleva a cabo en la superficie trabecular.

Tomando en consideración que se presentan los resultados de un solo individuo, es necesario extender estos estudios a pacientes sanos de diferentes edades y sexo.

Referencias

1. Boskey A.L.. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 30-31.: 83-91. (1998)
2. Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis Int.* 13: 97-104. (2002)
3. Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater. Chem.*14: 2115-2123. (2004)
4. Paschalis EP, Glass EV, Donley DW, Eriksen EF. Bone mineral and collagen quality in iliac crest biopsies of patients given teriparatide: new results from the fracture prevention trial. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 4644-4649. (2005)
5. Aparicio S, Doty SB, Camacho NP, Paschalis EP, Spevak L, Mendelsohn R, Boskey AL. Optimal methods for processing mineralized tissues for Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *Calcif Tissue Int.* 70: 422-429. (2002)
6. Faibish D, Gomes A, Boivin G, Binderman I, Boskey A. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone*, 36: 6-12. (2005)
7. Paschalis EP, Betts F, DiCarlo E, Mendelsohn R, Boskey AL. FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcif Tissue Int.* 61: 487-492. (1997)
8. Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, Boskey AL. In situ análisis of mineral content and crystallinity in bone using infrared microspectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. *Bioch et Bioph Acta* 1527: 11-19. (2001)
9. Pasteris JD, Wopenka B, Freeman JJ, Rogers K, Valami-Jones E, Houwen JAM, Silva MJ. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25: 229-238. (2004)
10. Camacho NP, Rinnerthaler S, Paschalis EP, Mendelsohn R, Boskey AL, Fratzl P. Complementary information on bone ultrastructure from scanning small angle X-ray scattering and Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Bone* 25, 3: 287-293. (1999).