



Predicción de las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro según su microestructura y composición

Pablo Blázquez-Carmona¹, Juan Mora-Macías^{2*},
Antonia Pajares³, Álvaro Mármol² y Esther Reina-Romo⁴

¹ Departamento de Ingeniería Mecánica y Diseño Industrial, Universidad de Cádiz, pablo.blazquez@uca.es

² Departamento de Ingeniería Minera, Mecánica, Energética y de la Construcción, Universidad de Huelva, juan.mora@dimme.uhu.es, alvaro.marmol@dimme.uhu.es

³ Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales, Universidad de Extremadura, apajares@unex.es

⁴ Departamento de Ingeniería Mecánica y Fabricación, Universidad de Sevilla, erreina@us.es

El tejido óseo inmaduro generado durante procesos de regeneración ósea como fracturas simples o distracción osteogénica, es inicialmente un tejido heterogéneo que evoluciona mediante remodelación por la actividad de osteoblastos y osteoclastos, influido por la tensión mecánica a la que está sometido. Este tejido óseo inmaduro alcanza al final del proceso de regeneración unas propiedades mecánicas y microestructurales similares a las del hueso cortical. La caracterización del mismo a diferentes escalas es crucial para desarrollar modelos micromecánicos que optimicen los parámetros mecánicos de los que depende el proceso, controlando así la regeneración y previniendo las no uniones.

La distracción osteogénica consiste en la separación gradual de dos segmentos óseos mediante el alargamiento del callo. Tiene gran importancia clínica por su aplicación en la corrección de defectos o alargamiento de extremidades para la rectificación de asimetrías óseas. Este estudio examina la evolución temporal del tejido óseo inmaduro en 6 muestras de callo de distracción en el metatarso de oveja. Se analizó el módulo elástico mediante nanoindentación, la microarquitectura trabecular vía microCT y la composición mediante análisis de cenizas y espectroscopia Raman.

A escala macroscópica, el tejido óseo inmaduro del callo de distracción mostró un aumento considerable de la fracción de tejido óseo, debido principalmente al ensanchamiento de las trabéculas. Los ratios mineral/matriz medidos mediante espectroscopia Raman aumentaron hasta alcanzar niveles propios del hueso cortical durante la regeneración. Sin embargo, el módulo elástico local se mantuvo por debajo de los niveles en hueso cortical. Durante la consolidación del callo, el tejido óseo inmaduro experimentó cambios en la fracción de cenizas y en los porcentajes de calcio y fósforo. Correlacionando estos datos, se identificaron seis expresiones estadísticamente significativas para predecir el módulo elástico del tejido óseo inmaduro, a nivel local y aparente, en función de la fracción de ceniza, el porcentaje en volumen de tejido óseo y la composición química basada en espectroscopia Raman.

Se concluye que la microarquitectura del tejido óseo inmaduro del callo de distracción desempeña un papel más significativo que su composición química en la determinación del módulo elástico aparente del tejido. Se demostró que los parámetros Raman proporcionan correlaciones más significativas con el módulo elástico a nivel microscópico que el contenido de mineral obtenido del análisis de cenizas.

Palabras clave: tejido óseo inmaduro, callo, distracción osteogénica, nanoindentación, microCT, espectroscopia Raman, composición, módulo elástico

1. Introducción

Durante los procesos de regeneración ósea, como la distracción osteogénica, la curación de fracturas o la adaptación a implantes, la estructura y la composición del nuevo tejido óseo mineralizado, tejido óseo inmaduro, cambian continuamente debido al crecimiento y a las respuestas al entorno tisular, incluidos los factores físicos, químicos, y mecánicos [1-5]. Las matrices orgánicas e inorgánicas del tejido óseo inmaduro sufren alteraciones en su estructura y composición [6-9] dando lugar a un comportamiento mecánico del tejido que depende del tiempo, con una rigidez inicial mucho menor que la de los huesos corticales y trabeculares maduros.

La microestructura y la composición del hueso desempeñan un papel crucial en su comportamiento estructural y mecánico macroscópico. Su relación se ha estudiado ampliamente en huesos corticales y trabeculares [10-13]. Se ha demostrado que el módulo elástico de los huesos maduros depende fuertemente del contenido mineral, mientras que la tenacidad se relaciona con la calidad de la matriz de colágeno [14]. Se han establecido correlaciones entre el módulo elástico y la densidad mineral ósea para estimar las propiedades mecánicas [15]. A escala macroscópica, el módulo elástico aparente (E) está relacionado con la densidad mineral aparente ρ (masa ósea mineralizada / volumen total, teniendo en cuenta la porosidad del hueso) a través de una relación exponencial ($E \propto \rho^b$). Para los huesos corticales, b oscila entre 4 y 7.4 [10,16] y para los huesos trabeculares suele ser inferior ($b = 1.27$ - 2.57 [17-19]), lo que indica una menor rigidez aparente. Una limitación de estos modelos es que no distinguen la influencia de la de la fracción de mineral, o fracción de cenizas, dentro de la fracción total de masa ósea mineralizada. Probablemente debido a este motivo y al efecto de las características microestructurales [15], la relación rigidez aparente versus densidad mineral aparente no es tan fuerte a nivel tisular, a escala menor. En el tejido óseo inmaduro, García-Rodríguez et al. [20] demostraron que una ecuación polinómica de 6º grado ajusta bien el módulo elástico frente a la fracción de cenizas, predicha por un modelo de homogeneización computacional multiescala. En su modelo *in silico*, asumieron una orientación isotrópica de las fibrillas de colágeno y utilizaron la fracción de ceniza reportada por Martínez-Reina et al. [6]. También proporcionaron una ecuación de regresión exponencial simple para predecir la rigidez del tejido basada en la fracción de cenizas α , $E = 12.88 \cdot \alpha^{2.75}$, con un coeficiente de correlación significativo. Hasta la fecha, ningún trabajo previo ha propuesto ecuaciones basadas en datos experimentales para predecir las propiedades mecánicas aparentes del tejido óseo inmaduro a escala micro o macroscópica considerando la estructura evolutiva de este tejido.

Se han desarrollado diversas técnicas para evaluar la matriz inorgánica ósea a escala macroscópica, con el fin de medir la densidad mineral ósea o el contenido mineral: tomografía computarizada [11,21], microtomografía computarizada (microCT), absorciometría de rayos X de energía dual [19], incineración de la muestra [6,16] o pesado [10,17]. Para tener en cuenta las variaciones locales en el contenido mineral, Turunen et al. [8] utilizaron la microespectroscopia infrarroja y Raman para estudiar los cambios en la composición química inorgánica durante el envejecimiento óseo y concluyeron que la microespectroscopia Raman es más sensible a cambios en la matriz inorgánica. Los procesos de regeneración ósea también se han monitorizado con espectroscopia Raman [22-24]. Estos trabajos mostraron un aumento de las relaciones mineral/matriz y cristalinidad y una reducción de la relación carbonato/fosfato tras 14 días de consolidación de una fractura. Sin embargo, sigue sin conocerse la evolución temporal a largo plazo de las propiedades mecánicas, químicas y morfológicas del tejido óseo inmaduro durante la consolidación en defectos óseos de tamaño crítico. Más allá del análisis de cenizas, hasta la fecha no se ha explorado el uso de espectroscopia Raman como datos de entrada fiables para generar expresiones matemáticas que permitan predecir las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro. En cuanto a las técnicas para evaluar las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro, los ensayos de nanoindentación *ex vivo* han demostrado su validez para tener en cuenta la heterogeneidad y examinar la calidad ósea a una escala inferior [2,25-27]. Por ejemplo, Manjubala et al. [26] y Mora-Macías et al. [27] midieron el módulo de nanoindentación del tejido óseo inmaduro durante los procesos de curación de fracturas y transporte óseo, respectivamente.

El objetivo principal de este estudio es identificar los cambios relacionados con el tiempo, a escala macro y microscópica, en las propiedades químicas, mecánicas y morfológicas del tejido óseo inmaduro durante la consolidación de un defecto óseo de tamaño crítico. Es necesario, para comprender mejor la micromecánica del tejido óseo inmaduro, desarrollar un modelo mecánico fiable de este tejido para mejorar la predicción de su rigidez. Para ello, a escala microscópica, se medirán las propiedades micromecánicas con nanoindentación; las características minerales y orgánicas se cuantificarán mediante espectroscopia Raman; y las características estructurales mediante microCT. A escala macroscópica, se evaluará la fracción de cenizas y composición de diferentes elementos, tras incinerar las muestras. Todos estos datos experimentales se utilizarán para elaborar una serie de ecuaciones que relacionen el módulo elástico, tanto a nivel microscópico como macroscópico (módulo elástico aparente), con las propiedades estructurales y químicas del tejido óseo inmaduro.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de muestras de tejido óseo inmaduro

Se analizaron muestras de tejido óseo inmaduro obtenidas en experimentos previos de distracción osteogénica *in vivo* en seis ovejas merino hembra esqueléticamente maduras [1,28]. Los animales siguieron un protocolo de intervención quirúrgica y alargamiento óseo aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Córdoba (Referencia 2021PI/21), en cumplimiento de la normativa europea (2010/63/UE) y nacional (RD 1201/2005). Durante la cirugía se implantó un fijador externo tipo Ilizarov en el metatarso y se realizó una osteotomía transversal en un tramo intermedio de la diáfisis. En consecuencia, cada metatarso se dividió en dos fragmentos óseos inicialmente inconexos, con su alineación asegurada por el dispositivo fijador. Tras un periodo de latencia de 7 días, durante el cual se inicia la cicatrización ósea mediante la formación de un callo blando preliminar, los fragmentos se separaron a razón de 1 mm/día durante 15 días. El callo óseo resultante, de 15 mm, se dejó mineralizar durante la fase posterior de consolidación. Los animales se sacrificaron en diferentes momentos de las fases de distracción y consolidación para analizar *ex vivo* diferentes estados de osificación del callo: días 18, 29, 47, 64, 126 desde la cirugía. Tras el sacrificio, los metatarsos intervenidos se almacenaron inmediatamente a -80°C . Posteriormente se cortaron dos rebanadas de cada callo según el plano frontal, cada una de aproximadamente 3 mm de grosor, para abordar las posibles diferencias en la dirección lateral-medial (Figura 1). Estos cortes se realizaron mientras la muestra estaba recién sacada del congelador para mantener la integridad tanto de los tejidos blandos circundantes como del propio callo. La primera rebanada se utilizó para análisis microTC, espectroscopia Raman y el análisis de nanoindentación. Para el microTC, la muestra se analizó directamente tras el corte. Sin embargo, las demás técnicas requirieron la embutición y el posterior pulido de la superficie para conseguir superficies planas y paralelas según el protocolo seguido en trabajos anteriores por Mora-Macías et al. [27]. La segunda rebanada se utilizó para analizar la composición química de cada callo óseo. Todas las muestras se almacenaron en gasas empapadas en PBS y envoltura de plástico a -80°C antes de cada análisis. Como referencia para la interpretación y discusión de los resultados de nanoindentación, microTC y análisis químico, también se cortaron y conservaron muestras corticales de un metatarso ovino no operado.

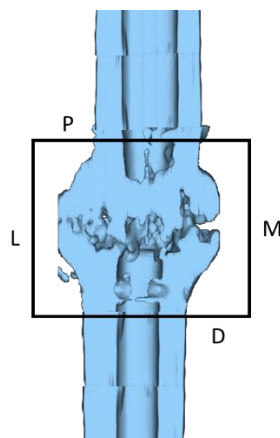


Figura 1. Esquema del plano frontal analizado en cada callo de distracción, en la parte central de la diáfisis de uno de los metatarsos intervenidos (P, proximal; D, distal; L, lateral; M, medial).

2.2. Medición propiedades mecánicas, composición y microestructura

Las imágenes de microCT se tomaron con un equipo Cougar® (Y.Cougar SMT, Yxlon, Hudson, Ohio, EE.UU.), tiempo de exposición de 9 s y tamaño del vóxel de $3.72\ \mu\text{m}$. Las tomografías se procesaron utilizando el programa Thermo Scientific Avizo Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US). A partir de cada reconstrucción 3D, se determinaron los siguientes parámetros: volumen óseo sobre volumen total (BV/TV), grosor trabecular medio (Tb.Th), separación trabecular media (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.Nm), grado de anisotropía (DA) e índice de modelo estructural (SMI, que define la prevalencia relativa de barras y placas en la estructura) y la conectividad de la red trabecular (Conn.D). En la muestra cortical, BV/TV fue el único parámetro calculado debido a la ausencia de estructuras trabeculares en este tejido.

Para las pruebas de espectroscopia y nanoindentación, en cada una de las muestras de callo de distracción, se seleccionaron cinco regiones de interés ($800 \times 800 \times 180\ \mu\text{m}$) dentro del callo de distracción. Se realizaron también mediciones en el hueso cortical de control. El análisis por espectroscopia Raman se realizó con un microscopio confocal Raman (HORIBA, Kyoto, Japón). Los espectros se recogieron con un láser rojo de $785\ \text{nm}$ a 100 aumentos, con un tiempo de integración de 5 segundos y 20 acumulaciones. El rango espectral fue de 200 a $1800\ \text{cm}^{-1}$. El microscopio se calibró con un patrón de silicio antes de obtener las imágenes de cada muestra. Todos los espectros se tomaron en zonas dentro de la trabécula, evitando así los puntos porosos. Las bandas para analizar la fase mineral ósea son la banda de fosfato a $959\ \text{cm}^{-1}$ ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}$), $422\ \text{cm}^{-1}$ ($\nu_2\text{PO}_4^{3-}$) y la banda de carbonato a 1070

cm^{-1} [29,30]. El ancho completo a mitad del pico (FWHM) de la banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ también es interesante debido que es una medida indirecta de la cristalinidad del mineral. Las bandas más utilizadas para medir el contenido de matriz son la prolina a 853 cm^{-1} , la hidroxiprolina a 872 cm^{-1} , la amida III a 1250 cm^{-1} , y Tirosina a 1607 cm^{-1} [29,30]. Nótese que se ha demostrado ampliamente que la relación $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ /Amida III es proporcional al contenido de calcio [30,31]. El fosfato $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, como ratio indicativa del contenido de matriz orgánica, es también ampliamente aceptado como medida de contenido mineral. Los espectros se procesaron en MATLAB (R2022a, MathWorks, Natick, Massachusetts, EE.UU.) para calcular los picos de intensidad (I), las áreas bajo los picos (A) y la amplitud como anchura de pico a la mitad del máximo (FWHM). Los parámetros y relaciones calculados se detallan en la Tabla 1, indicando si están relacionados con la fase mineral u orgánica.

Tabla 1: Parámetros calculados a partir del análisis mediante espectroscopia Raman: picos de intensidad (I), áreas bajo los picos (A), amplitud como anchura completa a la mitad del máximo (FWHM).

Parámetro	Fase del tejido	Cálculo
Cristalinidad	Mineral	$1/\text{FWHM}_{959}$
Carbonato/fosfato	Mineral	I_{1070} / I_{959}
$\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ /Prolina mineral/matriz	Mineral/Orgánica	I_{959} / I_{853}
$\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ /Tirosina mineral/matriz	Mineral/Orgánica	I_{959} / I_{1607}
$\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ /Amida III mineral/matriz	Mineral/Orgánica	A_{422} / A_{1250}
Hidroxiprolina/prolina	Orgánica	I_{872} / I_{853}

El módulo elástico del tejido se determinó mediante ensayos de nanoindentación en las mismas regiones de interés que se eligieron para el análisis Raman. La nanoindentación se realizó utilizando un indentador Nanotest (Nanotest, Micro Materials Ltd. Wrexham, Reino Unido) equipado con un indentador de diamante Berkovich. En cada región de interés se realizaron 16×16 indentaciones, separadas $50 \mu\text{m}$ en ambas direcciones, lo que corresponde al grosor mínimo de la trabécula del tejido óseo inmaduro [32]. Así, se realizaron un total de 256 indentaciones por región de interés. Durante cada indentación la carga se incrementó a un ritmo de 0.5 mN/s hasta un máximo de 5 mN . Una vez alcanzada la carga máxima en aproximadamente 10 s , se mantuvo constante durante 40 s . La descarga se realizó a la misma velocidad. Se utilizó el método de Oliver y Pharr para calcular el módulo elástico (E) a partir de los datos de carga-profundidad [33]. El módulo elástico medio y su desviación estándar se calcularon eliminando del cálculo las zonas de porosidad identificadas por las imágenes microscópicas o con módulo elástico inferior a 2 GPa .

Para el análisis de cenizas y el análisis elemental las muestras se molieron inicialmente con un mortero esterilizado. A continuación, se secaron inmediatamente en una cámara de secado al vacío (BINDER GmbH, Tuttlingen, Alemania) mediante ciclos de calentamiento a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante una hora cada uno, midiendo el peso de las muestras al final de cada ciclo hasta que se estabilizó. El peso resultante combina el correspondiente a las fases mineral y orgánica ($m_m + m_o$) del tejido óseo una vez eliminada el agua. Para la obtención de la fracción de ceniza, las muestras fueron incineradas en un horno (Nabertherm GmbH, Lilienthal Alemania) siguiendo el protocolo proporcionado por Martínez-Reina et al. [6]: (1) la temperatura se aumentó inicialmente de la temperatura ambiente a 250°C durante 30 minutos, y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora; (2) la temperatura se aumentó gradualmente a 650°C durante 30 minutos, y se mantuvo durante 2 horas; (3) la muestra se sacó del horno y se pesó; (4) la muestra se volvió a introducir en el horno a 650°C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos. Los pasos 3 y 4 se repitieron hasta alcanzar un peso constante. Este proceso permitió eliminar la materia orgánica. Por lo tanto, el peso obtenido al final del protocolo corresponde exclusivamente a la fase mineral (mm). La fracción de cenizas α se calculó finalmente mediante la ecuación 1. Finalmente, se realizó un análisis elemental de las muestras de ceniza para medir el porcentaje de masa de calcio (Ca), carbono (C), fósforo (P), sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg) y estroncio (Sr) en la fase mineral.

$$\alpha = \frac{m_m}{m_m + m_o} \quad (1)$$

2.3. Generación de ecuaciones de predicción de propiedades mecánicas

Los experimentos *ex vivo* descritos dilucidarán la evolución de las propiedades mecánicas y químicas del tejido óseo inmaduro durante la consolidación a escala tisular, así como los cambios estructurales hacia una microarquitectura cortical. Los parámetros de composición química se utilizaron para definir ecuaciones que con un solo parámetro predicen el módulo elástico del tejido óseo inmaduro a lo largo del tiempo de regeneración (ecuación 2):

$$E = a \cdot x^b \quad (2)$$

donde E es el módulo elástico, a son b constantes empíricas derivadas de datos experimentales, y la variable x representa el parámetro predictor. Específicamente, las constantes empíricas se ajustaron utilizando el módulo elástico medio por muestra medido por nanoindentación, evaluando los siguientes parámetros experimentales como predictores: fracción de ceniza ($x = \alpha$), contenido de calcio ($x = Ca$) y contenido de fósforo ($x = P$) medidos por análisis químico, y ratios Raman, $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ /Amida III ($x = A_{422}/A_{1250}$) y $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ /Tirosina ($x = I_{959}/I_{1607}$).

Los modelos basados en la ecuación 1 predicen el módulo elástico a escala local. Se propuso también una función de dos parámetros para diferenciar la influencia del volumen óseo (BV/TV) y la fracción de cenizas (α) en un módulo elástico aparente E^* a escala macroscópica, como se ha aplicado previamente en estudios de hueso cortical [16,34]:

$$E^* = a \cdot \alpha^b \cdot (BV/TV)^c \quad (3)$$

Para ajustar los coeficientes (a , b , c) de este segundo modelo, se empleó la fracción de volumen (BV/TV) medida mediante microTC. Además, el módulo elástico aparente se tomó mediante el modelo proporcionado por Blázquez-Carmona et al. [1], que se basa en datos experimentales de fuerza de la marcha medidos *in vivo* mediante fijadores externos instrumentados y una plataforma de carga durante pruebas de marcha en los mismos animales cuyos callos óseos se utilizaron en este trabajo.

3. Resultados

3.1. Evolución de las propiedades mecánicas, composición y microestructura

Los valores de modulo elástico obtenido en los ensayos de nanoindentación se muestran en la Tabla 2 [35]. En general, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes regiones de interés, por lo que se presenta el valor medio y desviación estándar de todas las regiones en cada callo de distracción, así como los valores medios en la región cortical analizada. El módulo elástico osciló entre 3.07 y 6.32 GPa en las primeras semanas tras la cirugía, y aumentó ligeramente hasta 9.25 GPa al cabo de seis meses. Durante el periodo analizado, las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro siguieron siendo significativamente inferiores a las del hueso cortical, cuyo módulo elástico medio fue de 16.44 GPa. Junto a los valores de módulo elástico local obtenido mediante nanoindentación (E) se representa también en la Tabla 2 el módulo elástico aparente E^* , a escala macroscópica, proporcionado por Blázquez-Carmona et al. [1].

Tabla 2: Parámetros medidos en cada uno de los ensayos realizados en el tejido óseo inmaduro de los callos de distracción, así como, si aplica, en el hueso cortical que se usó como control [35].

Parámetro	Tejido óseo inmaduro						Hueso cortical
	Día 18	Día 29	Día 47	Día 64	Día 112	Día 161	
E (GPa)	6.32±4.20	3.07±1.78	7.88±3.56	8.62±3.95	8.02±2.11	9.25±2.93	16.44±2.79
E^* (GPa) [1]	0.001	0.008	0.512	0.634	1.459	7.54	-
BV/TV	0.4459	0.4708	0.6188	0.6180	0.6416	0.6886	0.9680
$Tb.Th$	0.1088	0.1254	0.2095	0.2806	0.2420	0.2954	-
$Tb.Sp$	0.0735	0.1558	0.1290	0.1735	0.1359	0.1336	-
$Tb.Nm$	5.4855	3.5562	2.9542	2.2052	2.6462	2.3310	-
$ConnD$	126.6028	42.0621	9.3251	7.9852	5.0036	2.4655	-
DA	0.4619	0.4976	0.4649	0.5018	0.4501	0.4901	-
SMI	-4.5311	-2.1155	-2.3889	-4.6880	-4.5459	-6.7429	-
$1/FWHM_{960}$	0.052±0.007	0.051±0.005	0.050±0.006	0.046±0.006	0.054±0.003	0.049±0.005	0.055±0.005
I_{1070} / I_{960}	0.23±0.05	0.23±0.04	0.21±0.03	0.22±0.04	0.29±0.03	0.22±0.03	0.23±0.03
I_{959} / I_{853}	5.47±1.62	3.77±1.07	4.38±0.99	4.80±1.49	6.42±1.67	4.73±1.34	5.86±1.56
I_{959} / I_{1607}	8.42±3.00	6.50±1.92	9.01±1.92	9.35±3.46	9.91±2.89	10.62±2.13	12.26±2.72
A_{422} / A_{1250}	1.39±0.25	1.16±0.21	1.37±0.21	1.48±0.26	1.52±0.34	1.60±0.28	2.31±0.53
I_{872} / I_{853}	1.15±0.12	1.09±0.08	1.11±0.09	1.21±0.13	1.12±0.10	1.18±0.11	1.31±0.21
α (%)	28.9	15.5	46	40.8	53.3	56.7	66.3
C (%)	0.16	0.23	0.15	0.37	0.36	0.65	0.56
Ca (%)	45.9	35.7	47.2	43.5	46.7	48.0	47.2
K (%)	0.48	0.71	0.34	0.53	0.15	0.13	0.08
Mg (%)	0.57	0.51	0.90	0.57	0.73	0.45	0.45
Na (%)	1.80	2.70	1.59	2.43	1.08	1.09	1.04
P (%)	23.45	20.03	24.16	22.49	23.11	23.39	23.74
Sr (%)	0.021	0.022	0.021	0.024	0.015	0.014	0.027

La Tabla 2 muestra también la evolución de los parámetros estructurales medidos mediante microCT en el tejido óseo inmaduro de los callos de distracción, así como en el hueso cortical, solo aplicable a BV/TV . El BV/TV aumentó durante la mineralización. Los callos se mineralizaron parcialmente poco después de la intervención, comprendiendo el 44.6% del volumen total del callo al cabo de 18 días. El volumen óseo aumentó ligeramente con el tiempo, alcanzando el 68.9% a los 161 días. Durante todo el periodo analizado, los callos tenían una fracción volumétrica de tejido mineralizado inferior a la del tejido cortical circundante (98.7%). El tamaño de las trabéculas aumentó significativamente durante el periodo de regeneración, pasando de aproximadamente 0.11 mm a 0.29 mm. Por el contrario, la separación trabecular no mostró una evolución específica. Tanto el número de trabéculas, $Tb.Nm$, como la conectividad, $Conn.D$, mostraron un patrón similar. Poco después de la cirugía se observó un elevado número de estructuras trabeculares con alta conectividad. Sin embargo, a medida que las trabéculas aumentaban de tamaño, estos parámetros disminuían rápidamente y se estabilizaban. El grado de anisotropía (DA) se mantuvo constante entre 0.45-0.51. Así pues, aunque las estructuras mostraban una cierta orientación preferente

durante la formación trabecular, no eran ni perfectamente isotropas ($DA=0$) ni completamente anisótropas ($DA=1$). Por último, se observa un aumento negativo del índice del modelo estructural (SMI), lo que indica un aumento de la concavidad de las superficies trabeculares.

En este estudio, se analizó la estructura química del tejido óseo inmaduro y el hueso cortical adyacente tanto a escala microscópica como a macroscópica. En la escala microscópica, en la Tabla 2 se muestra la evolución de los parámetros Raman detallados en la Tabla 1, calculados para cada callo de distracción y el cortical. Los datos se proporcionan como las relaciones medias de todas las regiones de interés y todos los espectros tomados de cada una de las muestras. No se observaron tampoco en este caso diferencias significativas entre los resultados de las diferentes regiones de interés dentro del callo de distracción. Según los resultados obtenidos el tejido óseo inmaduro presentaba un grado de cristalinidad ($1/FWHM_{959}$) comparable al del tejido cortical desde pocos días después de la cirugía, sin evolución apreciable con el tiempo. Durante la regeneración, la relación carbonato-fosfato (I_{1070}/I_{959}) también fue similar a la del hueso cortical, sin diferencias significativas en su desviación estándar. Los indicadores que recogen la cantidad de mineral de Fosfato v1 y v2 con respecto a los componentes orgánicos de la matriz (Prolina, Tirosina y Amida III: I_{959}/I_{853} , I_{959}/I_{1607} y A_{422}/A_{1250}) comenzaron significativamente más bajos, justo tras la cirugía, en el tejido óseo inmaduro en comparación con el tejido óseo maduro, tendiendo a aproximarse a los valores corticales durante la fase de regeneración. No se encontró ninguna tendencia en las relaciones hidroxiprolina/ prolina (I_{872}/I_{853}), pero sus valores medios en el tejido óseo inmaduro fueron significativamente inferiores a las observadas en el cortical.

En cuanto a la composición química a escala macroscópica, en la Tabla 2 se muestra la evolución de la fracción de cenizas (α) a lo largo del tiempo de regeneración. La masa relativa del componente mineral frente al componente orgánico del tejido aumentó significativamente en el tejido óseo inmaduro a lo largo de la consolidación. En consecuencia, la fracción de cenizas aumentó progresivamente de 15-29% en los callos menos maduros a 57% en los más osificados. Este callo más consolidado alcanzó una fracción de cenizas similar a la del tejido cortical, 66%.

La composición elemental también se proporciona en la Tabla 2. El contenido de carbono del tejido óseo inmaduro (C%) aumentó ligeramente de 0.20 a 0.65%. Sin embargo, el porcentaje de este elemento en todas las muestras, incluidas sus zonas corticales, se mantuvo relativamente bajo ($< 1\%$). El calcio (Ca%) fue el elemento predominante en todas las muestras, con porcentajes que oscilaron entre el 35.71 y el 47.96%. Obsérvese que el contenido de calcio en una muestra de hueso cortical se estimó en 47.25. Aunque se observa un ligero aumento a lo largo de la fase de regeneración, algunas de las muestras menos maduras ya mostraban niveles de calcio similares a los niveles corticales. El potasio (K%), el magnesio (Mg%) y el sodio (Na%) siguieron una tendencia similar. El contenido de estos elementos comenzó (0.48- 0.71% para K; 0.57-0.89% para Mg; 1.80-2.71% para Na) por encima de los valores corticales de 0.08%, 0.45%, y 1.04%, respectivamente. Sin embargo, todos ellos se normalizaron a lo largo del periodo analizado. El fósforo (P%) fue el segundo elemento más abundante, manteniendo un porcentaje relativamente constante entre el 20.03 y el 24.16%, similar al del hueso cortical (23.74). Por último, el porcentaje de estroncio (Sr%) no fue significativo en ninguna muestra, manteniéndose en torno al 0.02% en todos los casos.

3.2. Modelos de predicción del módulo elástico del tejido óseo inmaduro

De todos los parámetros medidos se utilizaron seis en la generación de modelos de predicción. Para la predicción del módulo elástico local a partir de datos de composición se ajustaron los valores medios de módulo elástico medido mediante nanoindentación con la fracción de ceniza (α), el contenido de calcio (Ca), el contenido de fósforo (P), ratio Raman $v_2PO_4^{3-}/Amida\ III$ (A_{422}/A_{1250}) y $v_1PO_4^{3-}/Tirosina$ (I_{959}/I_{1607}). Los resultados mostraron una evolución clara con el tiempo de la fracción de ceniza (Figura 2) y en el caso del análisis elemental se eligieron calcio y fósforo por ser elementos mucho más abundantes. Su evolución temporal, junto a la del resto de parámetros seleccionados para elaboración de modelos predictivos puede observarse gráficamente en la Figura 2. En el caso de los parámetros Raman se escogieron aquellos que gráficamente presentan una evolución más coherente comparada con la evolución del módulo elástico medido mediante nanoindentación, E (Figura 2). Para la predicción del módulo elástico aparente (E^*) se utilizó una ecuación de dos parámetros, ajustando E^* frente a la fracción de ceniza (α), que representa la evolución de la composición a nivel global, así como el volumen óseo (BV/TV), que introduce el efecto sobre la rigidez aparente de la evolución de la microestructura. Las expresiones obtenidas se recogen en la Tabla 3 [35] junto a los parámetros que indican el nivel de bondad y significatividad de cada ajuste: R^2 y p . Todos los ajustes de un solo parámetro demostraron una elevada fuerza predictiva del módulo elástico del tejido óseo inmaduro, con valores de R^2 superiores a 0.5 y la mayoría de los valores p inferiores a 0.05. Los mayores grados de significación en la predicción de E se observaron en las correlaciones basadas en los parámetros Raman. Los mayores valores resultantes del exponente predictor (b) se encontraron en el contenido de calcio medido mediante análisis químico ($b= 2.86$) y por espectroscopia Raman (Amida III mineral/matriz, $b= 2.64$). La expresión para predicción del módulo elástico aparente también resultó ser altamente significativa ($R^2 = 0.88$ y $p= 0.005$). El valor del exponente de la fracción volumétrica que mejor se ajustaba era casi 3 veces el valor del exponente de la fracción de cenizas, 9.98 frente a 3.88.

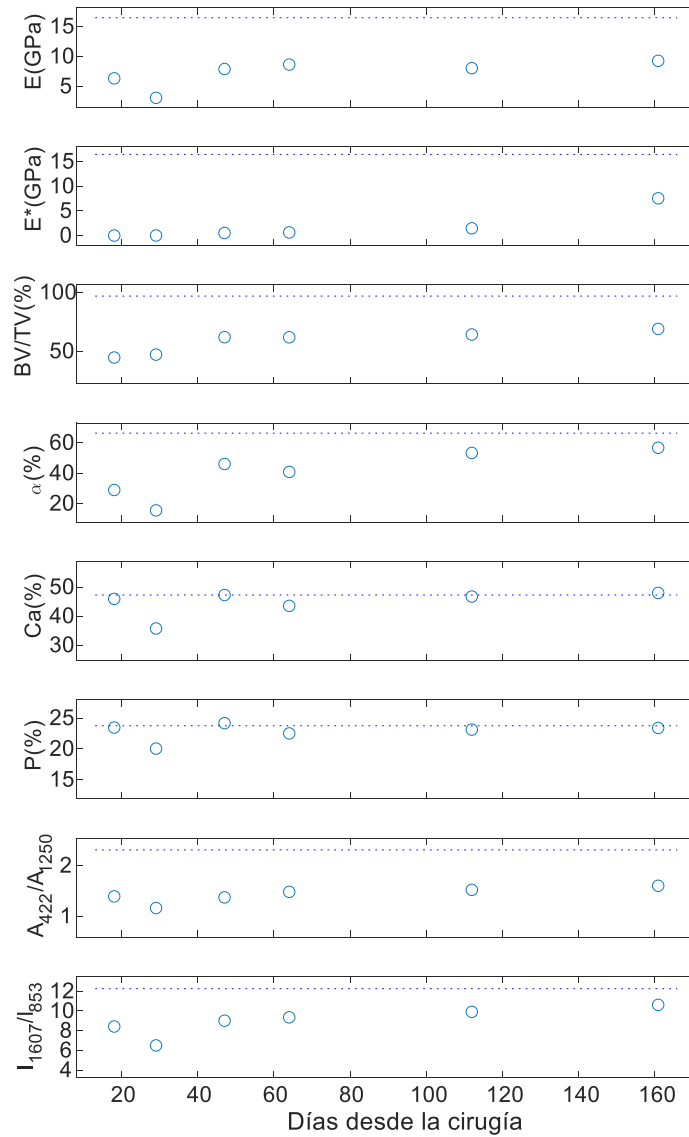


Figura 2. Evolución gráfica de los parámetros usados en los modelos predictivos: módulo elástico local (E), módulo elástico aparente (E^*), volumen óseo (BV/TV), fracción de cenizas (α), contenido de calcio (Ca), contenido de fósforo (P), ratios Raman $\nu_2PO_4^{3-}/$ Amida III (A_{422}/A_{1250}) y $\nu_1PO_4^{3-}/$ Tirosina (I_{959}/I_{1607}) [35].

Tabla 3: Ecuaciones de predicción de módulo elástico local (E) y aparente (E^*) a partir de los diferentes parámetros estructurales y químicos medidos, constantes de cada ecuación y parámetros de bondad de ajuste, R^2 y valor p . En estas ecuaciones el módulo elástico se calcula en GPa, para el contenido de calcio (Ca) y fósforo (P), la fracción de ceniza y el volumen óseo expresados por unidad [35].

Parámetro	Ecuación de predicción	a	b	c	R^2	p
Fracción de ceniza	$E = a \cdot \alpha^b$	20.84	1.26	-	0.55	0.091
Calcio	$E = a \cdot Ca^b$	71.56	2.86	-	0.72	0.031
Fósforo	$E = a \cdot P^b$	349.85	2.62	-	0.56	0.104
$\nu_1PO_4^{3-}/$ Tirosina mineral/matriz	$E = a \cdot (I_{959} / I_{1607})^b$	0.12	1.89	-	0.90	0.003
$\nu_2PO_4^{3-}/$ Amida III mineral/matriz	$E = a \cdot (A_{422} / A_{1250})^b$	2.79	2.74	-	0.83	0.011
Fracción de ceniza y volumen óseo	$E^* = a \cdot \alpha^b \cdot (BV/TV)^c$	2740	3.88	9.98	0.88	0.005

4. Discusión

Cuantificar la evolución de las propiedades estructurales, químicas y mecánicas del tejido óseo inmaduro es crucial para comprender la mecanobiología que subyace a la regeneración ósea y evaluar la eficacia de los métodos clínicos para el abordaje de defectos óseos de tamaño crítico. Igualmente, importante es el desarrollo paralelo de modelos numéricos que optimicen los parámetros ingenieriles clave para controlar este proceso biológico y prevenir las no uniones. Existe una notable carencia en la bibliografía de ecuaciones o modelos micromecánicos del tejido óseo inmaduro basados en datos experimentales que tengan en cuenta los cambios en las propiedades

del tejido en las distintas fases de regeneración. Este trabajo permite, desde un enfoque multiescala, cubrir esa carencia en datos experimentales sobre la evolución del tejido óseo inmaduro y generar, a partir de estos datos, nuevos modelos predictivos de la rigidez de este tejido a diferentes escalas según su microestructura y composición. Hasta donde saben los autores, a excepción del presente estudio, nunca se han establecido este tipo de modelos para tejido óseo inmaduro.

Los resultados de módulo elástico medido mediante nanoindentación reflejan una recuperación lenta de las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro a escala tisular a lo largo de su fase de remodelación, en concordancia con estudios anteriores [26,27]. Es importante destacar que los ensayos de nanoindentación excluyeron específicamente la influencia de la porosidad entre trabéculas en los datos medios proporcionados. En consecuencia, la menor rigidez observada sólo puede atribuirse a la presencia de microporosidades u otras características microestructurales a escalas de longitud más pequeñas, o a diferencias en la composición química y la organización de la fase mineral depositada.

Los resultados de parámetros obtenidos a partir de las imágenes microCT sobre la evolución de la microestructura del tejido óseo inmaduro ponen de relieve la evolución dinámica de la misma, desde numerosas trabéculas delgadas desorganizadas al principio de la fase de consolidación hasta una estructura con menos trabéculas, pero más gruesas y mejor interconectadas. La evolución del parámetro BV/TV es consistente con los resultados obtenidos en estudios previos en tejido óseo inmaduro [2] que utilizan otras técnicas bidimensionales. La evolución del resto de parámetros tridimensionales medidos a partir de imágenes de microCT que figuran en la Tabla 2 no han podido compararse directamente con otros resultados debido a la falta de datos en la literatura, hasta donde los autores saben.

En este estudio, la mineralización ósea durante la consolidación se cuantificó a escala microscópica utilizando varios parámetros Raman. La Tabla 3 muestra una evolución positiva entre la relación mineral/matriz de tirosina (I_{959} / I_{1607}) y amida III (A_{422} / A_{1250}) y el tiempo de consolidación, alcanzando valores comparables a los del hueso cortical en el día 161. Estas medidas proporcionan una evaluación cuantitativa de la mineralización ósea durante la consolidación, directamente relacionada con la fracción de cenizas [36]. La cristalinidad, que es una medida del desarrollo del tamaño de los cristales [8], se mantuvo casi constante durante la fase de consolidación, con valores similares a los del hueso cortical. Estos datos son coherentes parcialmente con resultados previos [22] que informaron de un aumento de las relaciones mineral/matriz, y también cristalinidad, durante los primeros 14 días de consolidación en defectos en cráneos mediante Espectroscopia Raman.

En la Tabla 2 también se aportan datos del análisis químico realizado mediante análisis de cenizas y estudio elemental. La fracción de cenizas y los contenidos de fósforo y calcio aumentaron de forma no lineal con el tiempo de consolidación, con una meseta cercana a los valores de referencia corticales. Los contenidos de fósforo y calcio también coinciden con los análisis por infrarrojos y rayos X de la hidroxiapatita natural [37]. En la literatura se han descrito numerosos sustitutos en los cristales de hidroxiapatita, incluyendo carbono, potasio, magnesio, sodio o estroncio. Para el potasio y el sodio, se cuantificó la disminución con el tiempo (Tabla 2) [38-40]. Sin embargo, ninguno de los sustitutos mencionados parece desempeñar un papel clave durante el proceso de regeneración ósea.

Los exponentes de las expresiones de la Tabla 3 (constantes de ajuste b y c) proporcionan información sobre el grado de influencia de la composición química (medida a escala macro, mediante análisis de cenizas y composición elemental, y a escala micro, mediante espectroscopia Raman) y la morfología microestructural, en las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro tanto a escala macroscópica como microscópica. Por ejemplo, la fracción de ceniza parece tener una influencia relativa menor en el módulo elástico medido mediante nanoindentación ($b = 1.26$) en comparación con los contenidos de calcio o fósforo ($b = 2.62 - 2.86$). Este exponente es también ligeramente inferior a los de las expresiones equivalentes que aparecen en la bibliografía [10,16,34]. Las diferencias pueden atribuirse al uso de tejidos óseos compactos y esponjosos de diferentes especies de mamíferos, al rango de fracciones de cenizas analizadas y a las diferentes condiciones de carga en la caracterización mecánica. El grado de significación de todas las correlaciones (R^2 en el rango de 0.55-0.90 y la mayoría de los valores p por debajo de 0.05) es coherente con trabajos anteriores [10,16,34]. Sin embargo, se encontró que los parámetros Raman, Amida III mineral/matriz y Tirosina mineral/matriz, se correlacionaban más significativamente con el módulo elástico que las fracciones de ceniza, calcio o fósforo. Nuestra hipótesis es que también podría deberse a una heterogeneidad química significativa en el tejido. Nótese que los espectros Raman se tomaron localmente en las mismas zonas de tejido óseo que las medidas por nanoindentación. Se definió una función de dos parámetros para explicar, mejor que las funciones de un solo parámetro, basadas únicamente en factores químicos, las propiedades mecánicas aparentes del tejido óseo inmaduro, a una escala mayor. Así, la combinación de la fracción de ceniza con la evolución del BV/TV proporciona una correlación significativa con el módulo elástico aparente (Tabla 3), representando el comportamiento mecánico a escala macro. En este caso, la diferencia sustancial entre la fracción de ceniza ($b = 3.88$) y los valores del exponente BV/TV ($c = 9.98$) indica una mayor influencia de la evolución del volumen óseo sobre el volumen total del callo (que abarca tanto las fases mineralizadas como las no mineralizadas) en las propiedades mecánicas aparentes del callo óseo durante la consolidación, en comparación con la influencia de la fracción de ceniza. Este hallazgo contrasta con informes anteriores sobre tejido cortical y trabecular en la literatura, donde la fracción de ceniza parece tener una influencia significativamente mayor sobre

la resistencia y el módulo óseos [34], posiblemente debido a la menor remodelación estructural y dependencia del tiempo de los tejidos óseos sanos.

En conclusión, este trabajo contribuye al desarrollo de nuevos modelos micromecánicos aplicables a simulaciones numéricas de procesos de regeneración ósea. También mejora la comprensión de la relación entre la composición química, la morfología estructural y las propiedades mecánicas del tejido óseo inmaduro a diferentes escalas de longitud mediante la combinación de múltiples técnicas *ex vivo*: microTC, nanoindentación, espectroscopia Raman y análisis químico y elemental. Se ha demostrado que el tejido óseo inmaduro presenta un aumento significativo del volumen óseo, controlado principalmente por el engrosamiento y la unificación de las trabéculas, junto con un aumento simultáneo de la fracción de ceniza aparente, el calcio y el contenido de fosfato. La expresión establecida para el módulo elástico aparente pone de relieve una influencia más significativa de la microarquitectura trabecular en evolución sobre el comportamiento mecánico aparente, a escala macroscópica, del callo óseo. A una escala menor, la relación mineral/matriz medida con espectroscopia Raman aumentó durante el periodo de regeneración analizado, alcanzando valores comparables a los del hueso cortical. Sin embargo, el módulo elástico local no aumentó lo suficiente como para alcanzar valores corticales, debido potencialmente al papel de las microporosidades dentro de las trabéculas. Las expresiones matemáticas que predicen la evolución del módulo elástico del tejido óseo inmaduro a esta escala demostraron que los parámetros Raman se correlacionan mejor con el módulo elástico que el contenido mineral aparente medido mediante análisis de cenizas. Por lo tanto, abogamos por el uso combinado de la espectroscopia Raman y la nanoindentación en la construcción de futuras ecuaciones de predicción para el tejido en regeneración, potencialmente reforzadas mediante la inclusión de un segundo parámetro para dar cuenta de las características estructurales a escala microscópica.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen los fondos del proyecto PID 2023-148828OB-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER/UE.

6. Referencias

- [1] Blázquez-Carmona P., Mora-Macías J., Morgaz J., Fernández-Sarmiento J.A., Domínguez J., Reina-Romo E. “Mechanobiology of bone consolidation during distraction osteogenesis: bone lengthening vs. Bone transport”. *Annals of Biomedical Engineering* **49**, 1209–1221 (2021)
- [2] Mora-Macías J., García-Florencio P., Pajares A., Miranda P., Domínguez J., Reina-Romo E. “Elastic Modulus of Woven Bone: Correlation with Evolution of Porosity and X-ray Greyscale”. *Annals of biomedical engineering* **49**, 180–190 (2021)
- [3] Wehrle E., Wehner T., Heilmann A., Bindl R., Claes L., Jakob F., Amling M., Ignatius A. “Distinct frequency dependent effects of whole-body vibration on non-fractured bone and fracture healing in mice”. *Journal of orthopaedic research* **32**, 1006–1013 (2014)
- [4] Paul G.R., Vallaster P., Rüegg M., Scheuren A.C., Tourolle D.C., Kuhn G.A., Wehrle E., Müller R. “Tissue-level regeneration and remodeling dynamics are driven by mechanical stimuli in the microenvironment in a post-bridging loaded femur defect healing model in mice”. *Frontiers in cell and developmental biology* **10**, 856204 (2022)
- [5] Tourolle Né Betts D., Wehrle E., Paul G., Kuhn G., Christen P., Hofmann S., Müller R. “The association between mineralised tissue formation and the mechanical local in vivo environment: Time-lapsed quantification of a mouse defect healing model”. *Scientific reports* **10**, 1100 (2020)
- [6] Martínez-Reina J., García-Rodríguez J., Mora-Macías J., Domínguez J., Reina-Romo E. “Comparison of the volumetric composition of lamellar bone and the woven bone of calluses”. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* **232**, 682–689 (2018)
- [7] Isaksson H., Turunen M.J., Rieppo L., Saarakkala S., Tamminen I., Rieppo J., Kröger H., Jurvelin J. “Infrared spectroscopy indicates altered bone turnover and remodeling activity in renal osteodystrophy”. *Journal of bone and mineral research* **25**, 1360–1366 (2010)
- [8] Turunen M., Saarakkala S., Rieppo L., Helminen H., Jurvelin J., Isaksson H. “Comparison between infrared and Raman spectroscopic analysis of maturing rabbit cortical bone”. *Applied spectroscopy* **65**, 595–603 (2011)
- [9] Reznikov N., Bilton M., Lari L., Stevens M.M., Kröger R. “Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale”. *Science* **360**, eaao2189 (2018)
- [10] Schaffler M., Burr D. “Stiffness of compact bone: Effect of porosity and density”. *Journal of biomechanics* **21**, 13–16 (1988)

- [11] Rho J., Hobato M., Ashman R. "Relations of mechanical properties to density and ct numbers in human bone". *Medical Engineering & Physics* **5**, 347–355 (1995)
- [12] Sevostianov I., Kachanov M. "Impact of the porous microstructure on the overall elastic properties of the osteonal cortical bone". *Journal of biomechanics* **33**, 881–888 (2000)
- [13] Budyn E., Jonvaux J., Funfschilling C., Hoc T. "Bovine cortical bone stiffness and local strain are affected by mineralization and morphology". *Journal of Applied Mechanics* **79**, 011008–1 (2012)
- [14] Zioupos P., Currey J.D. "Changes in the stiffness, strength, and toughness of human cortical bone with age". *Bone* **22**, 57–66 (1998)
- [15] Nobakhti S., Shefelbine S. "On the Relation of Bone Mineral Density and the Elastic Modulus in Healthy and Pathologic Bone". *Current osteoporosis reports* **16**, 404–410 (2018)
- [16] Currey J. "The effect of porosity and mineral content on the Young's modulus of elasticity of compact bone". *Journal of biomechanics* **21**, 131–9 (1988)
- [17] Keller T. "Predicting the compressive mechanical behavior of bone". *Journal of biomechanics* **27**, 1159–68 (1994).
- [18] Rice J., Cowin S., Bowman J. "On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density". *Journal of biomechanics* **21**, 155–68 (1988)
- [19] Bouxsein M., Radloff S. "Quantitative ultrasound of the calcaneus reflects the mechanical properties of calcaneal trabecular bone". *Journal of bone and mineral research* **12**, 839–46 (1997)
- [20] García-Rodríguez J., Martínez-Reina J. "Elastic properties of woven bone: effect of mineral content and collagen fibrils orientation". *Biomechanics and modeling in mechanobiology* **16**, 159–172 (2017)
- [21] Snyder S., Schneider E. "Estimation of mechanical properties of cortical bone by computed tomography". *Journal of orthopaedics research* **9**, 422–31 (1991)
- [22] Ahmed R., Law A., Cheung T., Lau C. "Raman spectroscopy of bone composition during healing of subcritical calvarial defects". *Biomedical optics express* **9**, 1704–1716 (2018)
- [23] Uthgenant B.A., Kramer M.H., Hwu J.A., Wopenka B., Silva M.J.C. "Skeletal self-repair: stress fracture healing by rapid formation and densification of woven bone. *Journal of bone and mineral research* **22**, 1548–1556 (2007)
- [24] Gamulin O., Serec K., Bilić V., Balarin M., Kosović M., Drmić D., Brčić L., Seiwerth S., Sikirić P. "Monitoring the healing process of rat bones using Raman spectroscopy". *Journal of Molecular Structure* **1044**, 308–313 (2013)
- [25] Leong P., Morgan E. "Measurement of fracture callus material properties via nanoindentation". *Acta Biomaterialia* **4**, 1569–1575 (2008)
- [26] Manjubala I., Liu Y., Epari D., Roschger P., Schell H., Fratzl P., Duda G. "Spatial and temporal variations of mechanical properties and mineral content of the external callus during bone healing". *Bone* **45**, 185–192 (2009)
- [27] Mora-Macías J., Pajares A., Miranda P., Domínguez J., Reina-Romo E. "Mechanical characterization via nanoindentation of the woven bone developed during bone transport". *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **74**, 236–244 (2017)
- [28] Blázquez-Carmona P., Mora-Macías J., Sanz-Herrera J.A., Morgaz J., Navarrete-Calvo R., Domínguez J., Reina-Romo E. "Mechanical influence of surrounding soft tissue on bone regeneration processes: a bone lengthening study". *Annals of biomedical engineering* **49**, 642–652 (2021)
- [29] Fraulob M., Pang S., Le Cann S., Vayron R., Laurent-Brocq M., Todatry S., Soares J.A., Jasiuk I., Haiat G. "Multimodal characterization of the bone-implant interface using Raman spectroscopy and nanoindentation". *Medical engineering & physics* **84**, 60–67 (2020)
- [30] Mandair G.S., Morris M.D. "Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength". *Bonekey reports* **4**, 620 (2015)
- [31] Roschger A., Gamsjaeger S., Hofstetter B., Masic A., Blouin S., Messmer P., Berzlanovich A., Paschalis E.P., Roschger P., Klaushofer K. "Relationship between the ν_2 PO 4/amide III ratio assessed by Raman spectroscopy and the calcium content measured by quantitative backscattered electron microscopy in healthy human osteonal bone". *Journal of biomedical optics* **19**, 065002–065002 (2014)

- [32] López-Pliego E.M., Giráldez-Sánchez M.Á., Mora-Macías J., Reina-Romo E., Domínguez J. “Histological evolution of the regenerate during bone transport: an experimental study in sheep”. *Injury* **47**, S7–S14 (2016)
- [33] Oliver W.C., Pharr G.M. “An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments”. *Journal of materials research* **7**, 1564–1583 (1992)
- [34] Hernandez C.J., Beaupré G.S., Keller T.S., Carter D.R. “The influence of bone volume fraction and ash fraction on bone strength and modulus”. *Bone* **29**, 74–78 (2001)
- [35] Blázquez-Carmona P., Mora-Macías J., Pajares A., Mármon A., Reina-Romo E. “On the influence of structural and chemical properties on the elastic modulus of woven bone under healing”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **12**, 1476473 (2024)
- [36] Gourion-Arsiquaud S., Burket J., Havill L., DiCarlo E., Doty S., Mendelsohn R., van der Meulen M., Boskey A. “Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age”. *Journal of bone and mineral research* **24**, 1271–1281 (2009)
- [37] Janicki T., Sobczak-Kupiec A., Skomro P., Wzorek Z. “Surface of root cementum following air-polishing with bioactive hydroxyapatite (Ca and P mapping). A pilot study”. *Acta of bioengineering and biomechanics* **14**, 31–8 (2012)
- [38] Katzenberg M.A. *Bone: Chemical Analysis*. Encyclopedia of Global Archaeology pp. 1560–1565, Springer (2020)
- [39] Bergstrom W.H., Wallace W.M. et al. “Bone as a sodium and potassium reservoir”. *The journal of clinical investigation* **33**, 867–873 (1954)
- [40] Buddhachat K., Klinhom S., Siengdee P., Brown J.L., Nomsiri R., Kaewmong P., Thitaram C., Mahakkanukrauh P., Nganvongpanit K. “Elemental analysis of bone, teeth, horn and antler in different animal species using non-invasive handheld X-ray fluorescence”. *Plos One* **11**, e0155458 (2016).