

Evaluación de la Mineralización en Mandíbula y Diente de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) Mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Presión Variable Acoplada a Detector de Espectroscopía de Rayos X de Energía Dispersiva

Evaluation of Mineralization in Jaw and Teeth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Variable Pressure Scanning Electron Microscopy Coupled to Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy Detector

Karina Godoy^{1,2,3}; Cristian Sandoval^{4,5}; Carlos Manterola-Barroso³;
Paulo Salinas⁶; Luis A. Salazar^{2,3} & Mariana Rojas⁷

GODOY, K.; SANDOVAL, C.; MANTEROLA-BARROSO, C.; SALINAS, P.; SALAZAR, L. A. & ROJAS, M. Evaluación de mineralización en tejido óseo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante microscopía electrónica de barrido de presión variable acoplada a detector de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva. *Int. J. Morphol.*, 40(2):530-539, 2022.

RESUMEN: En salmonicultura se utilizan imágenes de rayos X, para evaluar la columna vertebral y las aletas, pero estas no permiten cuantificar los minerales que constituyen el hueso, para esto se utilizan otras técnicas que son destructivas. La Microscopía Electrónica de Barrido de presión variable (VP SEM) acoplada al detector espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) acoplado, nos permite analizar la microestructura y a la vez determinar elementos químicos, porcentaje y distribución presentes en puntos específicos en una muestra. Se utilizaron 5 truchas control y 5 con deformidad mandibular, de agua dulce en etapa de smolt, se analizó la estructura y mineralización del hueso, se eligieron en promedio 6 puntos de cuantificación por región de interés y se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (VP SEM-EDX). Los datos obtenidos muestran porcentaje en masa de Ca promedio en hueso articular de truchas fueron de 8.07 % y de 14.48 % en truchas con deformidad mandibular y control respectivamente y el porcentaje en masa promedio de P es de 4.07 % y 7.60 %, en truchas con deformidad mandibular y control respectivamente. Se identificó además otros elementos presentes en la muestra como Mg, Na, C, O, N, S, F, Zn, Al y Fe, con especial interés en el aumento de carbono en las muestras analizadas con deformidad mandibular y la presencia de aluminio en todas las muestras. La Técnica de VP SEM-EDX, permite evaluar de forma directa, sin destrucción de la muestra y con una preparación mínima de la muestra. En el hueso, la aplicación más frecuente de SEM-EDX es la medición del contenido de Ca y P y la relación que existe entre estos elementos Ca/P, en la muestra. Paralelamente la técnica nos permite la detección de otros microelementos provenientes del agua o de la alimentación y que eventualmente pueden provocar alteraciones en los peces, confirmando la hipótesis que el microanálisis elemental tiene utilidad para la salmonicultura.

PALABRAS CLAVE: Microanálisis elemental, Espectroscopía de rayos X (EDX); Hueso; Trucha arcoíris.

INTRODUCCIÓN

Durante la formación del esqueleto ocurren procesos tales como migración, condensación osteocondro progenitora, diferenciación y maduración. La diferenciación de células madre mesenquimales y hematopoyéticas da ori-

gen a dos tipos de osificación intramembranosa y osteocondral. La osificación intramembranosa genera osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y la osteocondral a condroblastos, condrocitos. El proceso se completa con la

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Centro de Biología Molecular y Farmacogenética, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

³ Núcleo Científico y Tecnológico en Biorecursos (BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁴ Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Salud, Universidad Santo Tomás, Los Carrera 753, Osorno, Chile.

⁵ Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁶ Laboratorio de Morfología Animal & Experimental, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

⁷ Programa de Biología Integrativa, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

secreción de proteínas y depósito de minerales, generando matriz ósea orgánica e inorgánica (Haga *et al.*, 2004; Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2007). Se ha descrito que el proceso de formación de hueso está finamente regulado, existiendo más de 20 genes responsables, con varias rutas de señalización que intervienen a través de familias de proteínas Bmps, Shh Wnt y Notch, que convergen en un factor de transcripción, run-2 (Ducy *et al.*, 1997; Day *et al.*, 2005; Lin & Hankenson, 2011; Zhao *et al.*, 2019). En salmónidos, el hueso se caracteriza por ser acelular, es decir, hay ausencia de osteocitos en el tejido (Baeverfjord *et al.*, 2019). En este sentido, Witten & Huysseune (2009) indican que las características del hueso de los teleósteos son: 1) ausencia de osteocitos; 2) ausencia de tejido hematopoyético de la médula ósea; 3) abundancia de pequeños osteoclastos mononucleados que realizan una resorción ósea no lacunar; y 4) una homeostasis mineral impulsada por P en lugar de Ca. Así, el proceso de formación y reabsorción ósea está regulado críticamente por la interacción entre los osteoblastos, responsables de la formación del hueso; y los osteoclastos, responsables de la resorción ósea (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*; Baeverfjord *et al.*). Los osteoblastos sintetizan los componentes orgánicos de la matriz ósea (proteínas, proteoglicanos) que a su vez son responsables del inicio de la mineralización y la consecuente formación de hueso (Fernández *et al.*).

Los peces de cultivo, principalmente salmonídos, se han visto afectados por anomalías esqueléticas (Lall & Lewis, 2007; Haga *et al.*, 2011). La ocurrencia depende en gran medida de la especie, las condiciones de cultivo y la edad de los peces (Boglione *et al.*, 2013). Así, las deformidades esqueléticas informadas frecuentemente en salmonídos cultivados ocurren en el cráneo/mandíbula (Quigley, 1997; Berg *et al.*, 2012) y columna vertebral (Berg *et al.*; Boglione *et al.*). Hace algunos años, en truchas (de agua dulce) en el Sur de Chile, está ocurriendo una alteración de los huesos articular y cuadrado, generando una prominencia en la zona que es visible externamente. Para estudios en tejido óseo de salmonídos, comúnmente se han utilizado radiografías para evaluar la morfología principalmente en columna vertebral y aletas (Witten & Hall, 2016; Holm *et al.*, 2020; Drábiková *et al.*, 2021), para la formación ósea los métodos tradicionalmente utilizados, son las técnicas histoquímicas de Von Kossa y Rojo de Alizarina (Rojas *et al.*, 2016; Witten & Hall) y para estudios de mineralización, se utilizan técnicas de análisis químico elemental, como espectrometría de absorción atómica, plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES), fluorescencia de rayos X (XRF) y difracción de rayos X (XRD) que requieren destruir la muestra, no permitiendo visualizar simultáneamente la microestructura y cuantificación de elementos (Michalak *et al.*, 2011; Oteyaka *et al.*, 2013; Kubaszewski *et al.*, 2014a,b). Siendo en el hue-

so, la aplicación más frecuente de EDX la medición del contenido de calcio (Ca) y fósforo (P) componentes principales de la matriz inorgánica (y la relación Ca/P). El uso de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) permite examinar la estructura y morfología con una resolución espacial alta, gran profundidad de campo mediante la interacción entre los electrones del cañón y la muestra, energías que son recolectadas a través de: detector de electrones secundarios (SE) y detector de electrones retrodifundidos o backscatter (BSE), entregando información sobre topografía y contraste químico de la muestra respectivamente. En este punto el equipo de Microscopía Electrónica de Presión variable (VP SEM) nos permite analizar una muestra en estado nativo, es decir, sin necesidad de recubrimientos metálicos (Au, Au/Pd) o de carbono, si además este equipo se encuentra acoplado a detector de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (VP SEM-EDX) representa una poderosa herramienta, que nos permite en aquellas regiones de la muestra que sean de interés, que presenten fallas o bien diferencias en densidad electrónica de sus componentes determinar qué elementos químicos, su distribución y en qué porcentaje están presentes en un tejido (Rojas *et al.*; Scimeca *et al.*, 2018; Shah *et al.*, 2019). Finalmente podemos indicar que la Microscopía Electrónica de Barrido acoplada a EDX, tiene interés y utilidad para la salmonicultura debido a que puede realizar una cuantificación porcentual y distribución elemental con un mínimo de preparación de muestra y además al no ser una técnica destructiva nos permite utilizar esa muestra para estudios histológicos posteriores. En el presente trabajo realizaremos un estudio de relación entre el análisis de la microestructura y microanálisis elemental de forma simultánea mediante VP SEM-EDX en mandíbulas y dientes de trucha arcoíris control sanas y con deformación mandibular.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestreo de especímenes. Se realizó la selección de individuos de agua dulce juveniles (smolt) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), de aproximadamente 20-30 cm de longitud, provenientes de piscicultura de pre-cordillera de la región de Los Lagos. Los peces son cultivados bajo normas generales (alcalinidad 20-200 mg/L CaCO₃, dureza 60-300 mg/L CaCO₃; NH₃ < 0,02mg/L; H₂S > 0,002mg/L; nitratos <100mg/L; Nitritos <0,055 mg/L; Nitrógeno amoniacoal <0,012 mg/L; Fosfatos >500 mg/L; Sulfatos > 45 mg/L. T° Agua 12 °C, O₂ de 8,5 ppm, CO₂ <7ppm y pH de 6,5 a 8,5, Hierro < 0,1 mg/L; Cobre < 0,05 mg/L; Plomo < 0,03mg/L y Mercurio < 0,05 mg/L y ATB 0,002–6,0 mg/L). Se obtuvieron 10 peces para análisis y fueron distribuidos en dos grupos. Grupo 1: cinco especímenes control,

clínicamente sanos, para lo cual se tomó en cuenta el nado regular, agudeza visual, que no presenten deformación alguna, sin erosiones de las aletas, ni lesiones o tumores visibles externamente en el cuerpo del pez que sean indicativos de la presencia de enfermedades por bacterias y/o parásitos (libre de patógenos); Grupo 2: cinco especímenes que presentaron deformidades en sus mandíbulas, sin erosiones de las aletas, ni lesiones o tumores visibles externamente en el cuerpo del pez, que sean indicativos de la presencia de enfermedades por bacterias y/o parásitos (libre de patógenos). Los peces de ambos grupos fueron eutanasiados por sobreexposición al anestésico, para esto fueron colocados en un contenedor con Benzocaína 20 % (Veterquímica S. A., Chile) 30-40 ppm por un tiempo mayor a 10 min. Los especímenes fueron almacenados a 0 °C en contenedor con hielo hasta llegar al laboratorio. Posteriormente las muestras de mandíbulas en el laboratorio fueron separadas del resto de la cabeza, limpiadas con agua dd y se trajeron cuidadosamente a fin de remover tejidos blandos sin ocasionar daño mecánico en la estructura y almacenadas en fijador para evitar degradación y/o contaminación del material. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético Científico de Universidad de La Frontera RES N°061-20 (08 de julio de 2020).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las muestras fueron fijadas en formalina 10 % tamponada hasta su análisis. Las muestras de mandíbulas fijadas se lavaron con agua destilada desionizada (x3) para eliminar restos de sales del fijador. Posteriormente se dejaron secar al ambiente sobre un papel absorbente para extraer el exceso de agua. Las muestras fueron adheridas al stub (portamuestra) mediante una cinta de carbono de doble faz. Se realizó la visualización de la muestra separada en tres regiones de inte-

rés: hueso dentario cerca de la sínfisis (incluidos los dientes), en el cuerpo (región media) y angular articular próximo al opérculo. La visualización de las estructuras morfológicas se realizó utilizando detector de contraste químico (Backscatter, BSE) en presión variable bajo los siguientes parámetros: energía de 10 KV, presión 20 Pa, WD 10 mm en Microscopio Electrónico de Barrido SU3500 HITACHI-Japón.

Microanálisis Elemental Semicuantitativo. Para la cuantificación y distribución elemental, se realizaron en promedio 6 espectros por cada región de interés en la mandíbula de los especímenes (incluidos los dientes). La adquisición se realizará bajo los siguientes parámetros: energía aplicada 15KV, presión 20 Pa, WD 10 mm utilizando Microscopio Electrónico de Barrido SU3500 HITACHI-Japón acoplado a detector EDS (QUANTAX-Bruker).

Análisis Estadístico. La normalidad de los datos fue evaluada a través de la prueba de D'Agostino-Pearson para estadística descriptiva. Las diferencias entre grupos fueron analizadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney. El valor $p<0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (GraphPad Software, versión 9.0, San Diego, CA, EE.UU.).

RESULTADOS

En la Figura 1 se ilustró una representación gráfica de los huesos maxila y mandíbula de los salmones; se caracterizan por los huesos dentario, angular-articular, retroarticular y también por la articulación con el hueso cuadrado, se incluyó en esta imagen las regiones de interés donde

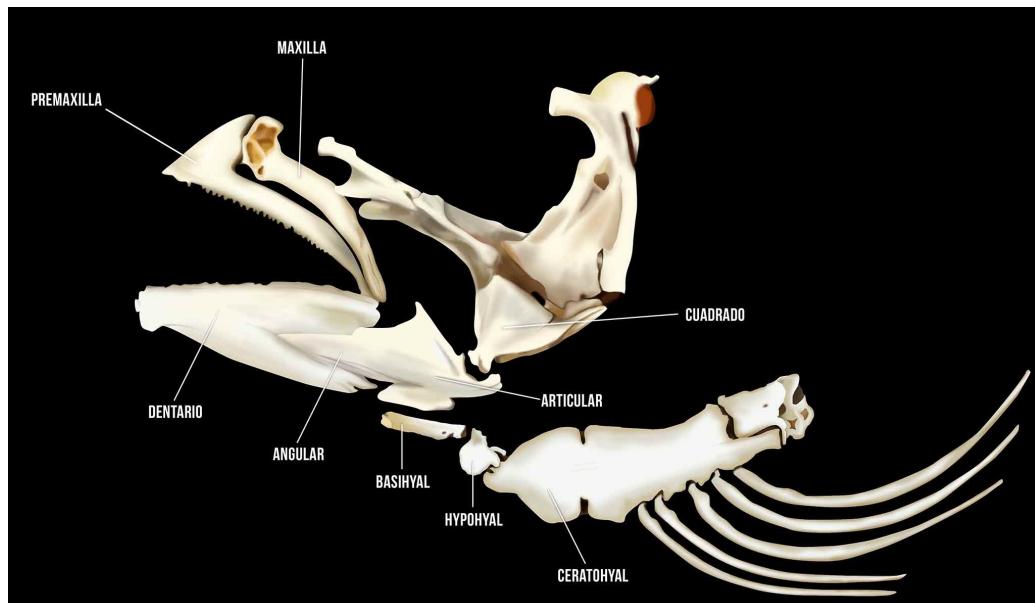


Fig. 1. Esquema que representa la boca abierta de un salmonido (regiones de interés). Se observa la mandíbula formada por el hueso dentario que tiene la forma de una horquilla, el angular que se introduce en el dental, articular, retroarticular. Además, se observa el hueso cuadrado completando la articulación, premaxilar, maxilar (Modificada de Bruno Chanet et Sandrine Tercierie. Museum National d'Histoire Naturelle).

se realizaron las mediciones de EDX en la mandíbula de truchas arcoíris control y truchas que presentan deformación mandibular (el análisis incluyó los dientes) (Datovo & Vari, 2013).

En la Figura 2 se observó la morfología y microestructura de los dientes de truchas control sanas (Figs. 2A-2B) y dientes de truchas que presentan deformidad mandibular (Figs. 2C-2D). En general se observó los dientes erupcionados, de forma curva, afiliados, cónicos y alargados. Es importante resaltar que se observaron dientes quebrados y con fracturas en la superficie en truchas que presentaron deformación mandibular, aunque el recambio dentario está presente también en peces sanos.

En la Figura 3 se muestra la microestructura de mandíbulas, la visualización se realizó utilizando el detector BSE (backscatter) que nos muestra contraste químico de las muestras, es así como áreas más oscuras representan menor densidad electrónica y más claras representan una composición

elemental de mayor densidad electrónica. En este caso para mandíbula de trucha control las imágenes mostraron uniformidad composicional, no se observó diferencias de densidad electrónica mayores, ni asociadas a alteraciones morfológicas de la superficie (Fig. 3A-3B), en cambio en truchas con deformidad mandibular, se observó claramente regiones más electrodensas que indican mineralización y otras menos electrodensas que deberían corresponder a componente más bien orgánico (Fig. 3C -3D).

En la Figura 4 se muestra el microanálisis elemental realizado tanto a muestras de dientes y mandíbulas en truchas que incluyen imagen (VP-SEM), espectro y tabulación de % de masas (EDX). Se observó que existe gran cantidad de elementos, de los cuales son principalmente de interés Ca, P y C. Los espectros presentaron diferencia composicional entre las muestras de los grupos analizados, siendo los valores que se obtuvieron para truchas control son mayores que los obtenidos para truchas con deformidad mandibular tanto en % Ca y P respectivamente, en cambio,

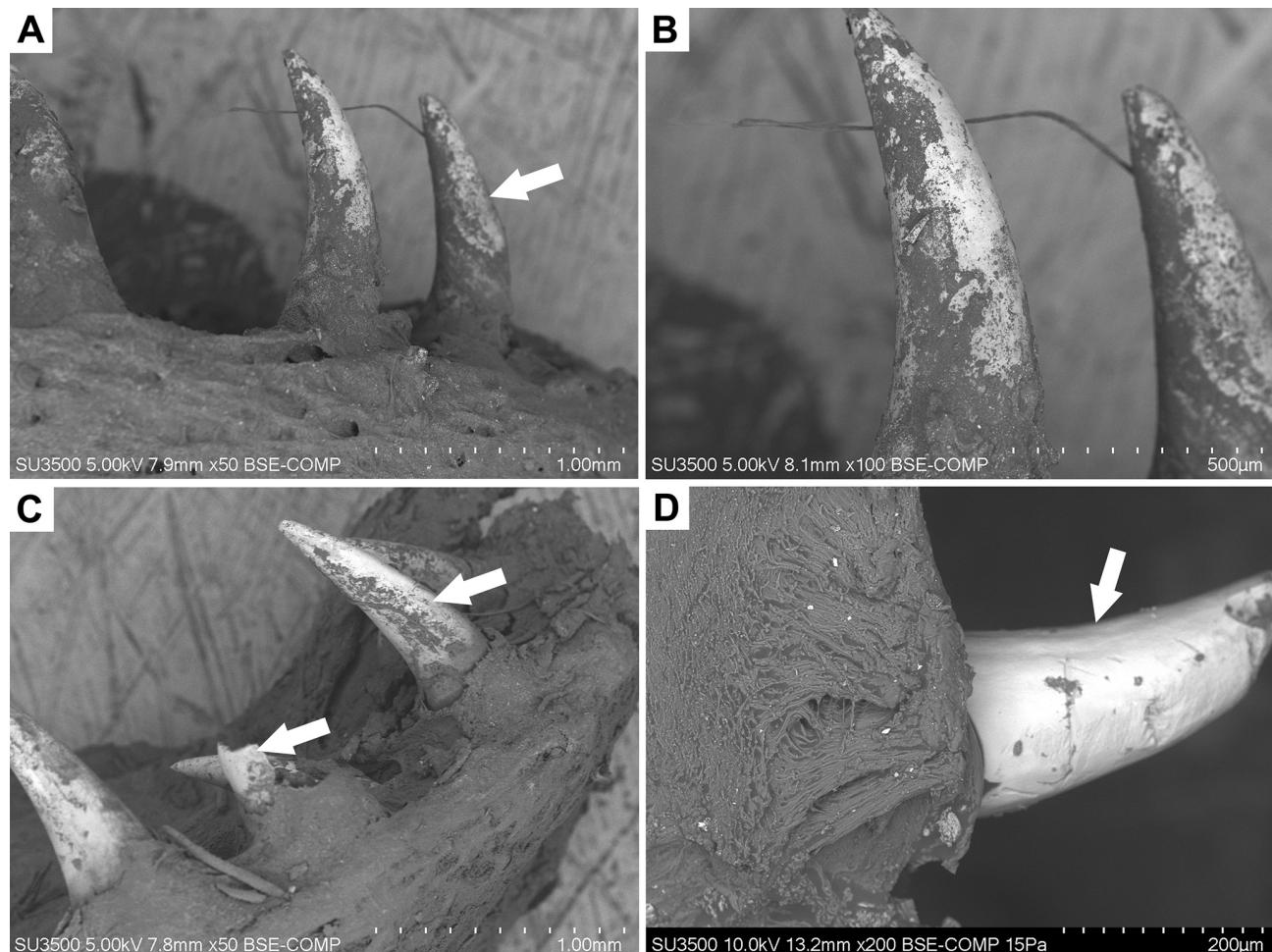


Fig. 2. Hueso dentario y dientes en trucha arcoíris. Dientes de trucha control (2A-2B). Diente de truchas con deformación mandibular (2C-2D). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI, Japón.

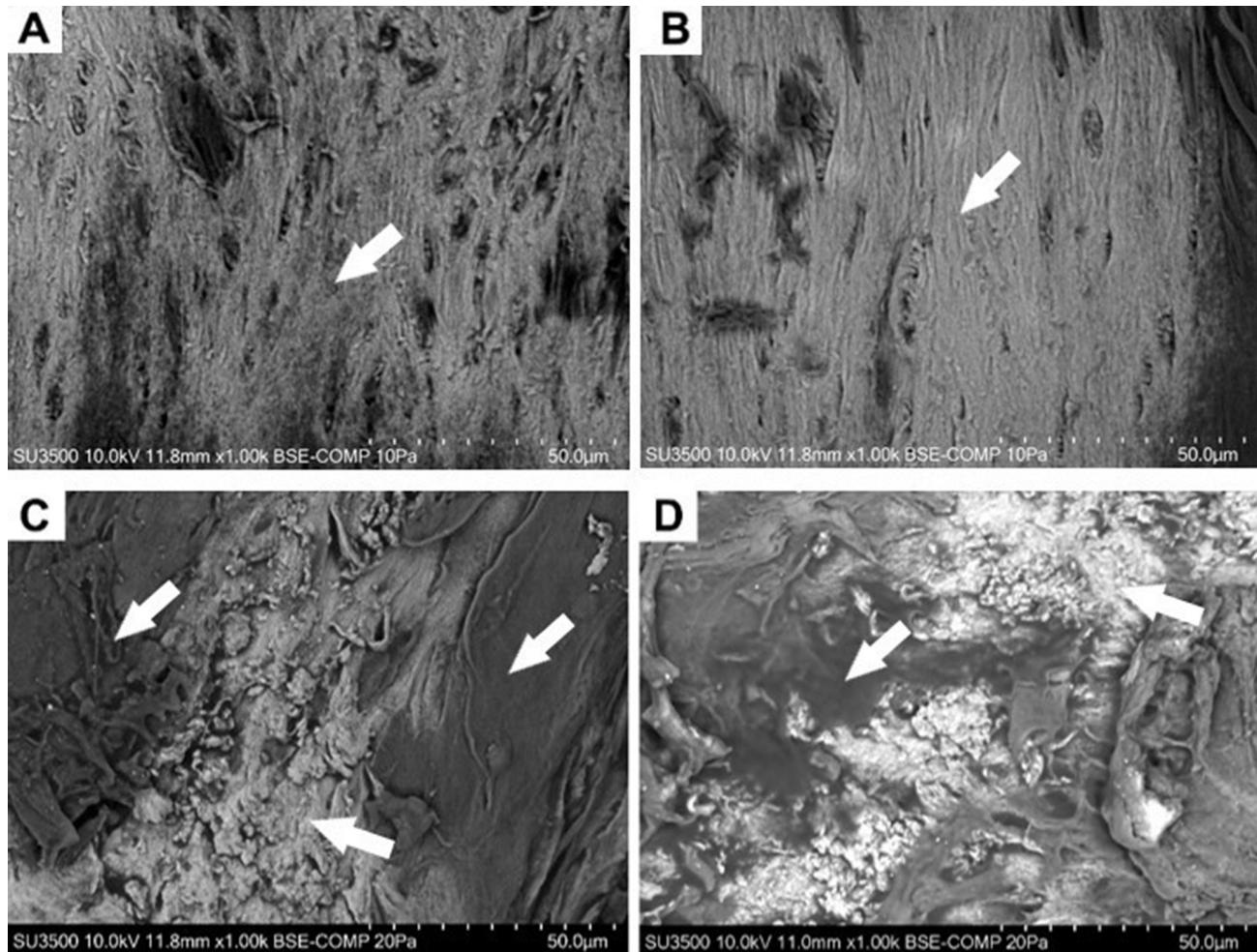


Fig. 3. Hueso mandibular en trucha arcoíris. Truchas control (3A-3B). Truchas con deformación mandibular (3C-3D). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI, Japón

los valores obtenidos para C son mayores en truchas con deformación mandibular que en truchas control tanto en dientes (Fig. 4A-4C) y mandíbulas (Fig. 4B-4D). Los datos obtenidos fueron analizados y tabulados para mandíbula y dientes (Tabla I y II). Cabe destacar que en diente se encontró otros elementos, como aluminio que no son propios del cristal de HPA, ni parte traza de la estructura, tanto en truchas control como truchas con deformidad mandibular, con valores que oscilan para truchas control, entre 0.69 % (rango 0.00-6.75) en diente y 0.46 % (rango 0.00-2.99) en mandíbulas (Tablas I y II). Mientras que en truchas con deformidad mandibular, los valores obtenidos son 0.34 % (rango 0.00-1.90) y 0.29 % (rango 0.00-3.81) (Tablas I y II). En mandíbulas los valores de Ca obtenido fueron de 14.48 y 8.07 % ($p<0.001$), para P los valores fueron 7.06 y 4.07 % ($p<0.001$) y para C los valores fueron 43.39 y 61.54 % ($p<0.001$) en truchas control y truchas con deformidad mandibular respectivamente (Tabla I). En dientes los valores de Ca fueron

de 25.1 % y 17.24 % ($p<0.001$), para el P los valores fueron de 11.17 y 8.30 % ($p=0.014$) y para C los valores fueron 23.90 y 38.67 % ($p<0.001$) en truchas control y truchas con deformidad mandibular respectivamente (Tabla II).

Se realizaron mapeos de distribución sobre mandíbulas y dientes, cada elemento es representado por un color (Figs. 5 y 6). En la muestra de mandíbulas control (Fig. 5) no se observó alteraciones como fallas o fracturas, el análisis presentó un patrón homogéneo de distribución elemental (intensidad de señal en color), tanto para Ca (magenta) y P (azul); en cambio, en mandíbulas que presentan deformidad mandibular (Fig. 6) se observó alteraciones en la superficie, no mostró uniformidad, existiendo áreas donde se disminuyó la intensidad señal de Ca (magenta), P (azul) y que coincide con aumento intensidad para C (amarillo) en el mismo lugar donde se observan alteraciones microestructurales.

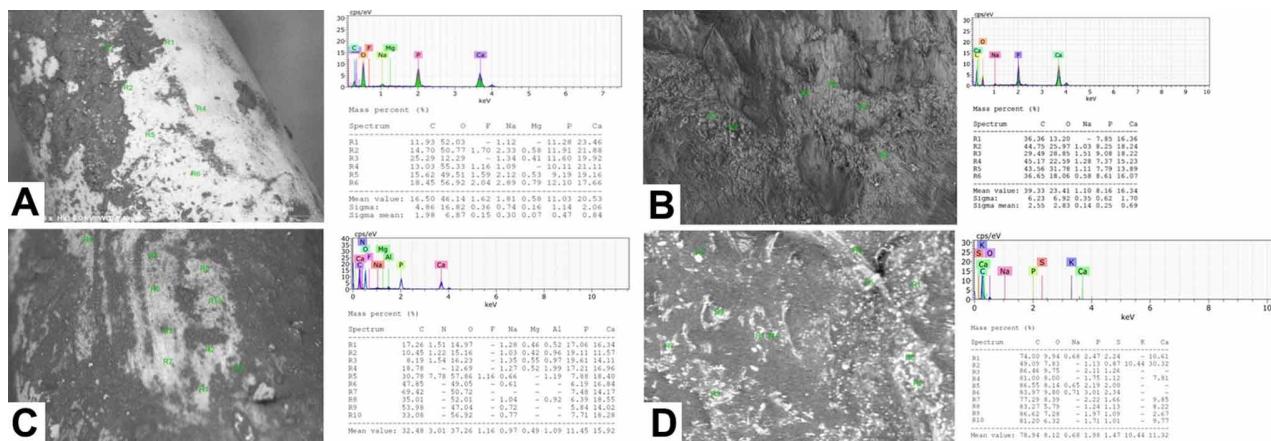


Fig. 4 Microanálisis elemental en truchas control. Diente de trucha control (4A). Hueso mandibular de trucha control (4B). Dientes de trucha con deformación mandibular (4C). Hueso Mandibular de truchas con deformación (4D). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI acoplado a EDX Quantax-Bruker.

Tabla I. Evaluación de mineralización en hueso mandibular de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando Microscopía Electrónica de Barrido acoplada a Detector de Espectroscopía de Rayos X de Energía Dispersiva (SEM-EDX).

	Mediana (mínimo - máximo)		Valor p
	Sano	Deforme	
Carbono (C)	43,39 (25,46 – 60,94)	61,54 (41,22 – 73,92)	<0,001
Oxígeno (O)	30,40 (19,84 – 42,86)	24,48 (14,62 – 39,38)	0,002
Calcio (Ca)	14,48 (7,48 – 21,85)	8,07 (1,93 – 15,94)	<0,001
Óxoforo (P)	7,60 (4,16 – 16,71)	4,07 (1,12 – 7,08)	<0,001
Magnesio (Mg)	0	0	1,000
odo (Na)	0,62 (0,00 – 2,15)	0,30 (0,00 – 0,88)	0,058
itrógeno (N)	2,97 (0,00 – 8,74)	1,87 (0,00 – 13,46)	0,156
zufre (S)	0	0,17 (0,00 – 1,14)	0,022
lúor (F)	0,03 (0,00 – 0,60)	0	0,157
luminio (Al)	0,46 (0,00 – 2,99)	0,29 (0,00 – 3,81)	0,106
inc (Zn)	0	0	1,000

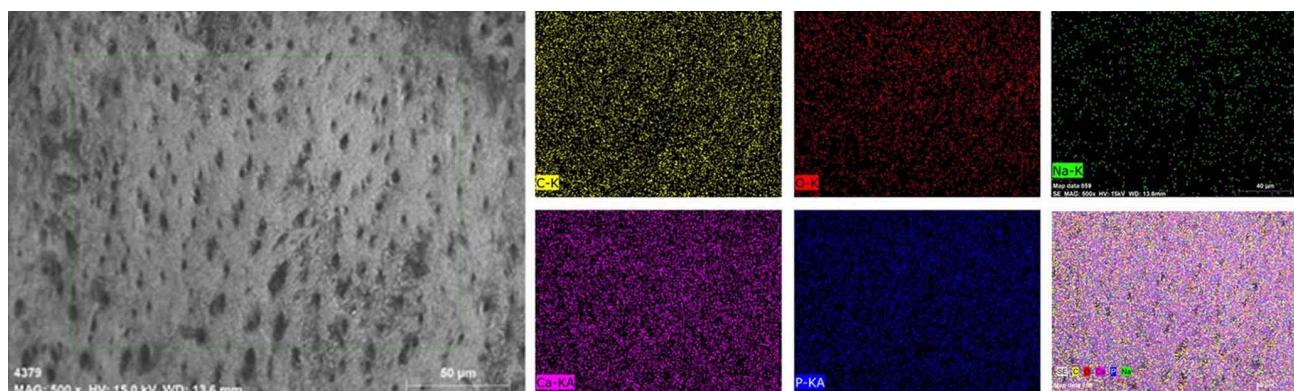


Fig. 5. Mapeo de distribución elemental en hueso mandibular de trucha arcoíris control. Elementos identificados por colores: Ca (magenta), P (azul), C (amarillo) y O (rojo) y Na (verde). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI acoplado a EDX Quantax-Bruker.

En diente la muestra de truchas control mostró distribución uniforme de los elementos, la región donde parece no existir mineralización, siempre se encontró carbono

presente pero en menor proporción que muestras de truchas con deformidad mandibular (Fig. 7), en cambio, en dientes de peces deformes (Fig. 8), se observa zonas de baja

mineralización afectando visiblemente más al P que Ca, lo que se relaciona con una microestructura que presenta que está visiblemente más alterada y fisurada, se reportó además en esas regiones una alta intensidad para el carbono

coincidente con el aumento porcentual registrado en las tablas I y II. Se observó además la presencia de aluminio al realizar la cuantificación, no siendo este un elemento propio característico.

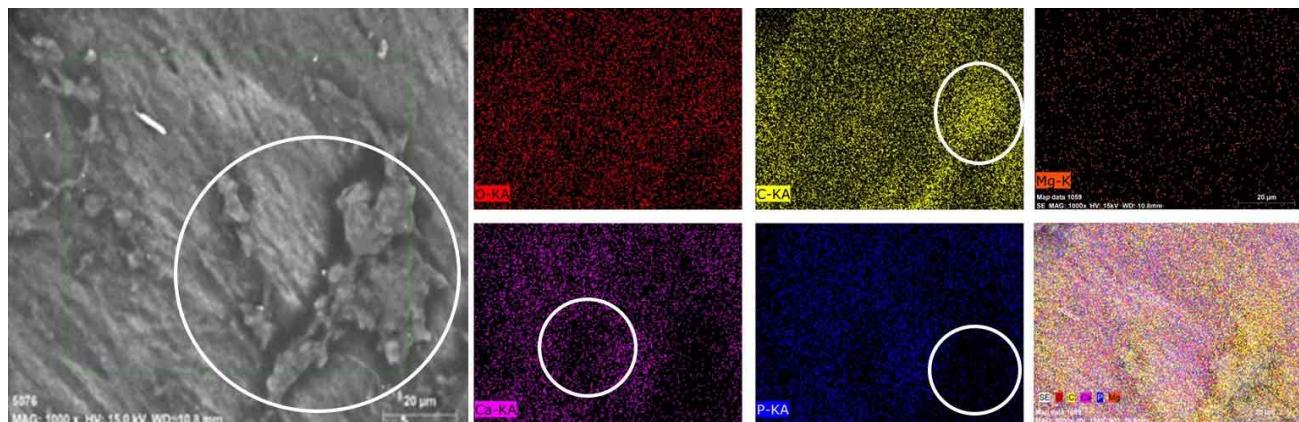


Fig. 6. Mapeo de distribución elemental en huesos mandibular de truchas arcoíris con deformación. Elementos identificados por colores: Ca (magenta), P (azul), C (amarillo) y O (rojo) y Na (verde). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI acoplado a EDX Quantax-Bruker.

Tabla II. Evaluación de mineralización en dientes de trucha arcoíris control (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando Microscopía Electrónica de Barrido acoplada a Detector de Espectroscopía de Rayos X de Energía Dispersiva (SEM-EDX).

	Mediana (mínimo - máximo)	Valor p	
	Sano	Deforme	
Carbono (C)	23,90 (15,21 – 32,86)	38,67 (21,50 – 50,20)	<0,001
Oxígeno (O)	33,12 (13,35 – 52,88)	32,43 (14,70 – 41,00)	0,457
Alcío (Ca)	25,10 (16,43 – 37,18)	17,24 (8,86 – 30,90)	<0,001
Óforo (P)	11,17 (7,47 – 19,11)	8,30 (3,63 – 14,90)	0,014
Magnesio (Mg)	0,30 (0,00 – 1,39)	0	<0,001
Nódio (Na)	1,05 (0,60 – 1,89)	0,974 (0,00 – 1,60)	0,772
Litrógeno (N)	3,50 (0,00 – 11,29)	1,79 (0,00 – 8,40)	0,064
Zufre (S)	0,38 (0,00 – 1,76)	0,15 (0,00 – 1,80)	0,278
Lúor (F)	0,46 (0,00 – 1,13)	0,06 (0,00 – 0,60)	0,001
Aluminio (Al)	0,69 (0,00 – 6,75)	0,34 (0,00 – 1,90)	0,692
Zinc (Zn)	0,29 (0,00 – 1,33)	0	0,012

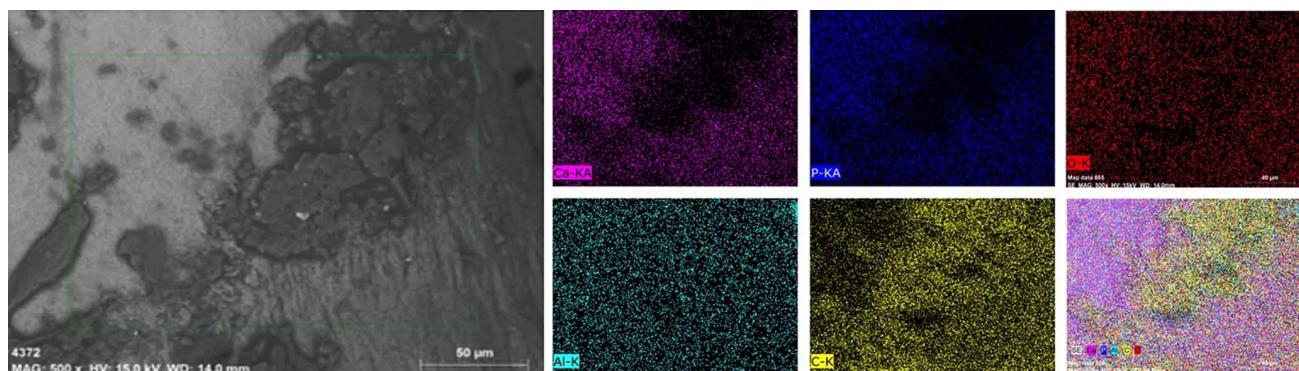


Fig. 7. Mapeo de distribución elemental en diente de trucha arcoíris control. Elementos identificados por colores: Ca (magenta), P (azul), C (amarillo) y O (rojo) y Na (verde). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI acoplado a EDX Quantax-Bruker.

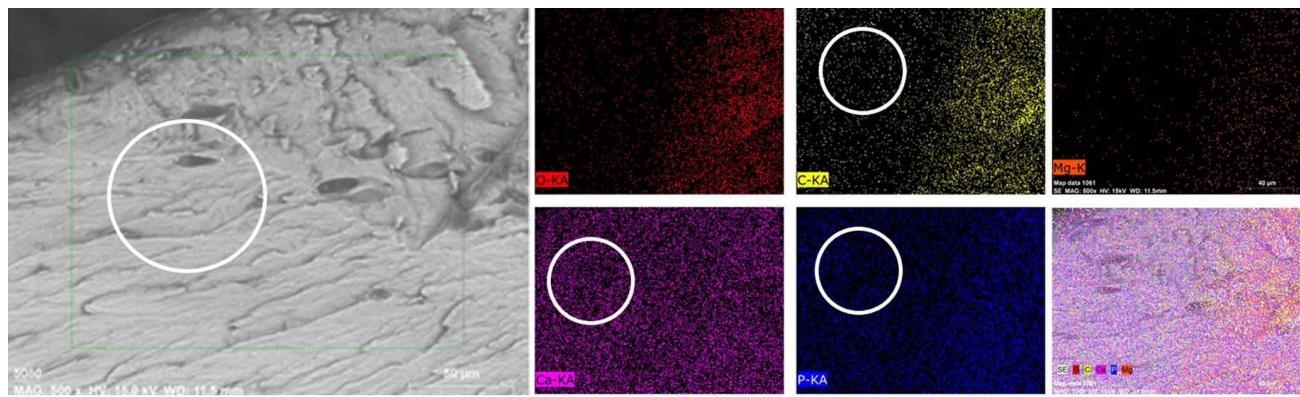


Fig. 8. Mapeo de distribución elemental en diente de trucha arcoíris con deformación mandibular. Elementos identificados por colores: Ca (magenta), P (azul), C (amarillo) y O (rojo) y Na (verde). Microscopio Electrónico de Barrido SU-3500 HITACHI acoplado a EDX Quantax-Bruker.

DISCUSIÓN

El hueso representa un reservorio de minerales presentes en el matriz inorgánica compuesta principalmente por Ca, P siendo estos indicadores del estado de mineralización y en menor concentración zinc, manganeso, magnesio (Prabhu *et al.*, 2016; Prabu *et al.*, 2017), fácilmente analizable mediante Microscopia Electrónica de Barrido de presión variable, ya que no necesitamos mayor preparación que la fijación del material para evitar su deterioro. Estas muestras al no requerir preparación, se pueden analizar microestructuralmente en su forma nativa, sin utilizar recubrimientos de ningún tipo que pueden eliminar microfracturas o defectos recién en formación de la superficie. En cuanto al análisis elemental, el contenido de Ca y P son parte estructural de los cristales de hidroxiapatita componente mayoritario de la matriz inorgánica del hueso (Baeverfjord *et al.*). Cuando analizamos las muestras de trucha con deformación mandibular podemos ver que existen diferencias tanto en hueso mandibular y en dientes, comparadas con muestras truchas control, es así como, se observa daño en dientes que incluye piezas fisuradas y quebradas (Figs. 2 y 3). Al realizar EDX sobre estas muestras se encuentra presencia de diferentes elementos, siendo de mayor interés Ca y P, estos elementos se encuentran en mayor proporción en truchas control que en truchas con deformidad mandibular y el mapeo de distribución elemental nos permitió verificar que esas regiones de interés que presentan anomalías de la microestructura coincidentemente tienen menor presencia de Ca y P, indicando que existe una disminución de la mineralización del hueso mandibular y dientes. El porcentaje de Ca informado en mandíbulas de truchas con deformidad mandibular fue de 8.07 %, en cambio, el porcentaje de Ca en truchas control es 14.48 %. El porcentaje en peso promedio informado de P en truchas con

deformidad mandibular es 4.07 %, en cambio en las truchas control es 7.60 %. En dientes los valores informados fueron de 25.10 % para peces sanos, en cambio para peces con deformidad mandibular fue de 17.24 %, para el P los valores porcentuales fueron de 8.30 % para truchas con deformidad mandibular y de 11.17 % para truchas control. Si comparamos estos valores con lo reportado en literatura, encontramos que los autores Shearer & Hardy (1987) reportaron niveles de P vertebral (con grasa) en trucha arcoíris normal de 8,8 % y en deficiencia de 6,2 %. Por otra parte, Ogino & Takeda (1978) reportaron que la vértebra de trucha arco iris normal contiene 6,5 % de P y vértebras deficientes contiene 3,2 % de P (no libre de grasa), estos valores fueron obtenidos mediante análisis químico proximal, es decir, las muestras fueron pulverizadas, tratadas con químicos para eliminar la materia orgánica, secadas y/o calcinadas y posteriormente analizadas por técnicas como destructivas como ICP OES, Absorción atómica, etc.

El detector EDX además identificó otros elementos presentes en la muestra que son considerados estructurales como Mg, Na, C, O, N, S, F y Zn y otro no estructural como Al. Es importante destacar de estos análisis composicionales: 1) Aumento del contenido de carbono, C, considerado un marcador de materia orgánica presente en una muestra, y aunque es parte de la composición normal, su porcentaje está muy por sobre lo esperado en truchas con deformidad mandibular, superando en todos los especímenes analizados el valor reportado en literatura, 2) Presencia de aluminio, Al, en todas las muestras, lo que se podría explicar porque algunas fuentes de agua, generalmente aquellas de cordillera, contienen metales, por lo tanto, monitorear el agua y sus composición es uno de los factores importantes de cultivo, ya que estos metales en concentraciones mayores a las toleradas por los peces, ponen en riesgo su estado sanitario (Reyne, 2008; Vega *et al.*, 2015).

Finalmente, las muestras se pueden analizar sin preparación alguna, en este caso el equipo permite visualizarlas en bajo vacío (VP-SEM), lo cual no requiere preparación de muestra para no alterar su estado físico y que además es fundamental para el análisis elemental. En cuanto EDX, a pesar que el análisis es semicuantitativo, es decir, entrega un valor porcentual, no una concentración absoluta es suficiente para discriminar áreas de la muestra donde existen cambios de composiciones de Calcio, Carbono y Fósforo y además la presencia de algún elemento no característicos de la muestra analizada que podría ser eventualmente patológico. También es interesante destacar que las muestras quedan indemnes y se pueden someter a otras técnicas histológicas e histoquímicas para tejido óseo para complementar los análisis.

CONCLUSIONES

En las truchas con deformidad mandibular, los porcentajes de Calcio (Ca) y Fósforo (P) son inferiores tanto en mandíbula como en diente, se observa un aumento del porcentaje de carbono a expensas de esta disminución mineral, indicando que existe un aumento del componente orgánico en las muestras.

Mediante este microanálisis elemental se han detectado además otros elementos que no son propios de la estructura como el aluminio pudiendo ser indicador de contaminación en el agua.

VP-SEM acoplado a EDX es una técnica rápida que permite observar la morfología y la mineralización de la muestra sin destruirla, lo que nos permite utilizar la muestra para otras técnicas. En cuanto a la mineralización nos entrega información acerca de la concentración (%) que si bien no es absoluta es un buen indicador, además no proporciona información sobre la distribución de estos elementos en la muestra.

GODOY, K.; SANDOVAL, C.; MANTEROLA, C.; SALINAS, P.; SALAZAR, L. A. & ROJAS, M. Evaluation of mineralization in jaw and teeth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using variable pressure scanning electron microscopy coupled to energy-dispersive X-ray spectroscopy detector. *Int. J. Morphol.*, 40(2):530-539, 2022.

SUMMARY: In salmon farming systems, X-ray images are used to evaluate the spine and fins, but these do not allow quantifying the minerals that make up the bone, for different techniques that are destructive are used. Variable Pressure Scanning Electron Microscopy (VP SEM) coupled to an Energy

Dispersive X-ray spectroscopy detector (EDX), allows us to analyze the microstructure and at the same time determine chemical elements, percentages, and distribution present at specific points in a sample. Five control and five jaw deformity trout, from freshwater and in the smolt stage were used. The structure and mineralization of the bone were analyzed, an average six quantification points were chosen per region of interest (ROI) and then they were analyzed by Scanning Electron Microscopy (VP SEM-EDX). The data obtained have shown the average mass percentage of calcium in trout joint bone was 8.07 % and 14.48 % in jaw deformity and control trout, respectively; and the average mass percentage of phosphorus is 4.07 % and 7.60 %, in jaw deformity and control trout, respectively. Other elements present in the sample were also identified, such as magnesium, sodium, carbon, oxygen, nitrogen, sulphur, fluorine, zinc, aluminium, and iron, with special interest the increase of carbon in the analyzed samples with mandibular deformity and the presence of aluminum in all samples. The VP SEM-EDX Technique allows direct evaluation, without destruction of the sample and with minimal sample preparation. In bone, the most frequent application of SEM-EDX is the measurement of the content of calcium (Ca) and phosphorus (P) and the relationship that exists between these elements, calcium/phosphorus (Ca/P), in the sample. At the same time, the technique allows us to detect other microelements from water or food that can eventually cause alterations in fish, confirming the hypothesis that elemental microanalysis is useful for salmon farming.

KEY WORDS: X-ray Spectroscopy (EDX); Bone; Rainbow Trout.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S. L.; Cohen, A. J. & Lassová, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell. Physiol.*, 213(3):635-41, 2007.
- Baeverfjord, G.; Prabhu, A.; Fjelldal, P.; Albrektsen, S.; Hatlen, B.; Denstadli, V.; Elisabeth Ytteborg, E.; Takle, H.; Lock, E.; Berntssen, M.; et al. Mineral nutrition and bone health in salmonids. *Rev. Aquac.*, 11(3):740-65, 2019.
- Berg, A.; Yurtseva, A.; Hansen, T.; Lajus, D. & Fjelldal, P. G. Vaccinated farmed Atlantic salmon are susceptible to spinal and skull deformities. *J. Appl. Ichthyol.*, 28(3):446-52, 2012.
- Boglione, C.; Gisbert, E.; Gavaia, P.; Witten, P. E.; Moren, M.; Fontagné, S. & Koumoundouros, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.*, 5(1):121-6, 2013.
- Datovo, A. & Vari, R. P. The jaw adductor muscle complex in teleostean fishes: evolution, homologies and revised nomenclature (osteichthyes: actinopterygii). *PLoS One*, 8(4):e60846, 2013.
- Day, T. F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L. & Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell*, 8(5):739-50, 2005.
- Drábiková, L.; Fjelldal, P. G.; De Clercq, A.; Yousaf, M. N.; Morken, T.; McGurk, C. & Witten, P. E. Vertebral column adaptations in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar*, L. as a response to dietary phosphorus. *Aquaculture*, 541:736776, 2021.

- Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A. L. & Karsenty, G. Osf2/Cbfα1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5):747-54, 1997.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I.; Alobera-Gracia, M. A.; del-Canto-Pingarrón, M. & Blanco-Jerez, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 11(1):E47-51, 2006.
- Haga, Y.; Du, S.; Shuichi Satoh, S.; Kotani, T.; Fushimi, H. & Takeuchi, T. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. *Aquaculture*, 315(1-2):26-33, 2011.
- Haga, Y.; Takeuchi, T.; Murayama, Y.; Ohta, K. & Fukunaga, T. Vitamin D₃ compounds induce hypermelanosis on the blind side and vertebral deformity in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 70:59-67, 2004.
- Holm, H.; Ytteborg, E.; Host, V.; Reed, A. K.; Dalum, A. S. & Bæverfjord, G. A pathomorphological description of cross-stitch vertebrae in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 526:735382, 2020.
- Kubaszewski, L.; Zioa-Frankowska, A.; Frankowski, M.; Nowakowski, A.; Czabak-Garbacz, R.; Kaczmarczyk, J. & Gasik, R. Atomic absorption spectrometry analysis of trace elements in degenerated intervertebral disc tissue. *Med. Sci. Monit.*, 20:2157-64, 2014b.
- Kubaszewski, L.; Ziela-Frankowska, A.; Frankowski, M.; Rogala, P.; Gasik, Z.; Kaczmarczyk, J.; Nowakowski, A.; Dabrowski, M.; Labedz, W.; Mie, kisiak, G.; et al. Comparison of trace element concentration in bone and intervertebral disc tissue by atomic absorption spectrometry techniques. *J. Orthop. Surg. Res.*, 9:99, 2014a.
- Lall, S. & Lewis, L. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish. *Aquaculture*, 267:3-19, 2007.
- Lin, G. & Hankenson, K. Integration of BMP, Wnt, and Notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.*, 112(12):3491-501, 2011.
- Michałak, I.; Chojnacka, K. & Marycz, K. Using ICP-OES and SEM-EDX in biosorption studies. *Microchim. Acta*, 172:65-74, 2011.
- Ogino, C. & Takeda, H. Requirements of rainbow trout for dietary calcium and phosphorus. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44:1019-22, 1978.
- Oteyaka, M. O.; Unal, H. H.; Bilici, N. & Taşçı, E. Characterization of powdered fish heads for bone graft biomaterial applications. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.*, 47(5):359-65, 2013.
- Prabhu, P.; Schrama, J. W. & Kaushik, S. J. Mineral requirements of fish: a systematic review. *Rev. Aquac.*, 8(2):172-219, 2016.
- Quigley, D. A lower jaw deformity in juvenile and adult Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15(6):206-9, 1997.
- Reyne, O. *La Industria Piscícola en la Región de La Araucanía: Diagnóstico, Problemáticas y Perspectivas para su Desarrollo*. Temuco, Universidad Católica de Temuco, 2008.
- Rojas, R. M.; Ramírez, M. E. & del Sol, M. Morphological study and mineral analysis of the lower mandible of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) from Scotland with mandibular deformation. *Int. J. Morphol.*, 34(3):1097-104, 2016.
- Scimeca, M.; Bischetti, S.; Lamsira, H. K.; Bonfiglio, R. & Bonanno, E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *Eur. J. Histochem.*, 62(1):2841, 2018.
- Shah, F. A.; Ruscsák, K. & Palmquist, A. 50 years of scanning electron microscopy of bone—a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Res.*, 7(1):1-15, 2019.
- Shearer, K. & Hardy, R. Phosphorus deficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed a diet containing deboned fillet scrap. *Progress. Fish Cultur.*, 49:192-7, 1987.
- Vega, R.; Zamorano, J.; Encina, F. & Mardones, A. Efecto del calcio sobre la toxicidad aguda de aluminio en alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestos en aguas de diferente pH. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(2):337-43, 2015.
- Witten, P. E. & Hall, B. K. Teleost skeletal plasticity: modulation, adaptation, and remodelling. *Copeia*, 103(4):727-39, 2016.
- Witten, P. E. & Huysseune, A. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol. Rev.*, 84(2):315-46, 2009.
- Zhao, B.; Xing, G. & Wang, A. The BMP signaling pathway enhances the osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with osteoporosis. *J. Orthop. Surg. Res.*, 14:462, 2019.

Dirección para correspondencia:

Dra. Mariana Rojas Rauco
Programa de Biología Integrativa
CBM, Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Santiago
CHILE

E-mail: mrojasr@u.uchile.cl