Estudio de la consolidación ósea en rata por microscopía electrónica de barrido ambiental

Study on the osseous consolidation in rat by environmental scanning electron microscopy

Rosario Neri Basurto* Lilia Solís Arrieta* Hilda Villegas Castrejón*

Abstract

The environmental scanning electron microscope (ESEM) has been recently applied to orthopedics, for which a study was performed on the modes of operation of this electron microscope. Optimal conditions were determined to obtain the best topographic image and to perform chemical analysis by X-ray dispersion during the process of bone consolidation. Fifteen male Wistar rats were used, grouped in three per each experimental day. Tibial fracture was provoked and a Kirschner wire was positioned. Rats were euthanized 0 (control), 7, 14, 21 and 28 days after surgery. According to the results, the best bone image was observed with retrodispersed electrons under high vacuum. In the chemical element determination lower variation coefficients were obtained under low vacuum for carbon and calcium; for phosphorus, under high vacuum, and in environmental mode, for magnesium, sodium, potassium and iron. In the process of bone consolidation, calcium levels in cortical bone diminished compared to controls, while the calcified bone callus was observed until day 14. Phosphorus concentration increased with time, in both cortical bone and bone callus. Magnesium presented a peak on day 14, and decreased drastically until day 28. Sodium rose continuously until day 28. The study of the chemical composition of bone by the ESEM is optimal in the environmental mode, since values of the elements present in lesser concentrations (1%) showed a lower variation coefficient. In bone consolidation process, calcium and phosphorus levels were found at a ratio of 2:1.

Key words: BONE COSOLIDATION, BONE ENVIROMENTAL SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, BONE CHEMICAL ANALYSIS.

Resumen

La aplicación del microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) en ortopedia no se había desarrollado hasta ahora, por lo que se realizó un estudio sobre los modos de operación del microscopio electrónico; así se determinaron las condiciones óptimas de obtención de la mejor imagen topográfica y del análisis químico por dispersión de rayos X durante el proceso de la consolidación ósea. Para ello se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar, que se agruparon en tres por cada día experimental, se les produjo una fractura en la tibia y se les colocó un alambre Kirschner; se efectuó eutanasia a los 0 (testigo), 7, 14, 21 y 28 días después de la cirugía. De acuerdo con los resultados, la mejor imagen del hueso se observó con electrones retrodispersados en alto vacío. En la determinación de elementos químicos se obtuvieron los menores coeficientes de variación en bajo vacío para carbono y calcio; en alto vacío, para fósforo, y en modo ambiental, para magnesio, sodio, potasio y fierro. En el proceso de la consolidación ósea los niveles de calcio en hueso cortical disminuyeron en comparación con el testigo, mientras que el callo óseo calcificado se observó hasta el día 14. La concentración de fósforo incrementó con el tiempo, tanto en hueso cortical como en callo óseo. El magnesio presentó un pico el día 14 y bajó drásticamente hasta el día 28; por último, el sodio subió de manera sostenida hasta el día 28. El mejor modo de estudiar la composición química del hueso en el ESEM es el modo ambiental, pues los valores de los elementos que están en menor concentración (1%) presentaron coeficiente de variación más bajo. En el proceso de consolidación ósea, los niveles de calcio y fósforo se encontraron en relación 2:1.

Palabras clave:CONSOLIDACIÓN ÓSEA, MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL DE HUESO, ANÁLISIS QUÍMICO EN HUESO.

Recibido el 6 de diciembre de 2006 y aceptado el 29 de febrero de 2008.

*Servicio de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Tlalpan, 14389, México, D. F., Tel. 5999-1000, ext. 19107, Fax: 5603-9197, correo electrónico: mneri@inr.gob.mx
Correspondencia: Rosario Neri Basurto, Servicio de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calzada México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Tlalpan, 14389, México, D. F.

Introduction

Because biological materials contain significant quantities of water and low or none electric conductivity, they cannot be observed in their natural state by conventional scanning electron microscopy. When water in the surface evaporates, the sample collapses and is distorted. Furthermore, water steam in the chamber decrease vacuum and contaminates the detector and the column. The low conductivity may cause the sample to charge electrically, what interferes with the electron beam and the emission of secondary electrons of the sample.[1,2] Therefore, biological samples must be fixed, dehydrated and covered with conductive material in order to be observed by this type of microscope.[3-5]

The environmental scanning electron microscope (ESEM) has two modifications to observe biological samples in their natural state and without a conductive cover.[6,7] The first one is an opening that limits the pressure below the objective lens and separates the samples from the vacuum column. This allows the column to be in high vacuum while the camera has up to 50 Torr pressure. Sample temperature and humidity can be manually regulated to create a proper environment and maintain samples in their natural state, without altering their morphology even for long observation periods. The second characteristic is the presence of a detector for gaseous secondary electrons (GSE) that avoids the charge effect.[1,2,8]

Small biological materials as protozoa, microorganisms, algae and fungus present high water content and are difficult to prepare conventionally. The ESEM allows these samples to be observed without previous treatment. Until now, application of this microscope has been limited to biology, because it is a recent technology and it has been used for tissue culture study, in which pressure and temperature have been manipulated and observing has had no difficulties.[7] It has also been used in medicine to detect heavy metals in tissues by energy dispersive X-ray (EDX), i.e.: cooper in hepatic tissue from patients with Wilson disease, lead in erythrocytes of patients with saturnism, mercury in skin, arsenic in skin intoxications and carcinomas, osmium tetroxide in skin traumatisms, etc.[9,10] Composition analyses for urinary crystals, renal and vesicular lithiasis are also possible.[11] Besides, immunomarking has been done to differentiate among dendritic cells and microglia in the rat eye.[12]

However, since there are no reports of its application in orthopedics, a study was done to determine optimal conditions for ESEM, in order to evaluate morphology and assess chemical elements by EDX during the osseous consolidation process in rat. At present, there are different methodologies to approach the

Introducción

Los materiales biológicos contienen cantidades significativas de agua y tienen baja o nula conductividad eléctrica, por ello no pueden ser observados en su estado natural en los microscopios electrónicos de barrido convencionales. El agua de la superficie se evapora, lo que provoca que la muestra se colapse y se distorsione. Además, el vapor del agua de la cámara disminuye el vacío y contamina al detector y a la columna. La baja conductividad puede dar como resultado que la muestra se cargue eléctricamente, lo cual interfiere con el haz de electrones y la emisión de los electrones secundarios de la muestra.[1,2] Por tanto, las muestras biológicas deben ser fijadas, deshidratadas y cubiertas con un material conductor, para ser observadas en este tipo de microscopios.[3-5]

Para observar las muestras biológicas en estado natural y sin una cubierta conductora, el ESEM presenta dos modificaciones.[6,7] La primera es una apertura que limita la presión que se encuentra bajo la lente objetiva y separa la muestra de la columna de vacío; esto permite que la columna esté en alto vacío, mientras la cámara tenga presión de hasta 50 Torr. La temperatura y humedad de la muestra pueden ser manualmente reguladas para proporcionar un ambiente adecuado y mantener la muestra en su estado natural, sin que altere su morfología aun en periodos largos de observación. La segunda característica es la presencia de un detector de electrones secundarios gaseosos (GSE), que evita el efecto de carga.[1,2,8]

Los materiales biológicos pequeños semejantes a protozoarios, microorganismos, algas y hongos, presentan alto porcentaje de agua y son difíciles de procesar de manera convencional, por lo que el ESEM permite observarlas sin previo tratamiento. Hasta ahora la aplicación de este microscopio ha sido limitada en biología, debido a que es una tecnología reciente y se ha aplicado al estudio del cultivo de tejidos, en el que se ha manipulado la presión y temperatura y se han observado sin dificultad.[7] En medicina también se ha utilizado para detectar metales pesados en los tejidos mediante dispersión de rayos X (EDX), por ejemplo: cobre en tejido hepático de pacientes con enfermedad de Wilson, plomo en eritrocitos de pacientes con saturnismo, mercurio en piel, arsénico en intoxicaciones y carcinomas de piel, tetraóxido de osmio en traumatismos de piel, etc.[9,10] También es posible analizar la composición de cristales urinarios, litiasis renal y vesicular.[11] Además se ha realizado inmunomarcaje para diferenciar entre células dendríticas y microglia en el ojo de la rata.[12]

Sin embargo, en ortopedia no hay informes de su aplicación, por lo que se realizó un estudio para determinar las condiciones óptimas en el microsco-

evolution of this phenomenon such as: radiography, densitometry and, indirectly, blood ion determination. However, these techniques do not yield information on the percentages of each mineral and their fluctuation throughout time. Furthermore, EDX microanalysis of the ESEM has several advantages: *a*) it is done *in situ*, *b*) it is quantitative (contrary to other techniques, which are qualitative) and *c*) it is specific for each zone of the bone (cortical and osseous callus).

Material and methods

Fifteen male, adult rats of the Wistar strain, with weight ranging from 300 to 400 g were used. Rats were located in acrylic cages (three per cage) at a 22 ± 2°C temperature, humidity and light were controlled (12 × 12 h). Animals within the weight range were used because it was considered that they were young adults which already had reached their maximum osseous development; males were used to avoid estrous cycle effects. Animals were treated according to the Official Mexican Norm NOM 062-ZOO-98, for care and use of laboratory animals.

One intraperitoneal dose of sodium pentobarbital (50 mg/kg) was applied. The right leg was shaved from the tibio-tarsal articulation to the heap and a longitudinal incision of skin and muscle was done. Separators were placed until bone was exposed to perform the fracture. Fracture line was made on the central part of the tibial diaphysis with a jewelry small saw, trying no to hurt soft tissue. Then a Kirschner wire was introduced (0.35 mm diameter) to unite the tibial fragments (proximal and distal) to attach the cut lines. Animals were distributed into three groups, according to the evolution of osseous consolidation. Euthanasia was done with carbon bioxide (CO_2) at days 0 (control), 7, 14, 21 and 28. Tibias were obtained and fixed with 2.5% glutaraldehyd in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 3 h. After that, the bones were washed four times, five minutes each, with the same buffer. A 1 cm length fragment was cut, including the fractured zone; then a longitudinal cut was done to expose cortical bone as well as osseous callus. Some of the fragments were sanded to obtain a smooth surface while others were left rough. Samples were dried at 37° C for 72 h and observed by ESEM* in the high vacuum (with secondary and retro-dispersed electrons), low vacuum and environmental (with gaseous secondary electrons) modes to obtain a better image.

The ESEM is equipped with an X-ray disperser** for chemical element quantification. Five analyses were done in a crossed pattern on the cortical bone and osseous callus. Determination was done in a semi-quantitative way in high vacuum mode (in charged and non-charged bone), low vacuum and environmental

pio electrónico de barrido ambiental, para evaluar la morfología y para la cuantificación de elementos químicos por dispersión de rayos X (EDX), durante el proceso de consolidación ósea en rata. Actualmente hay diferentes metodologías para abordar la evolución de este fenómeno, como: radiografías, densitometrías y, de manera indirecta, la determinación de iones en sangre, pero no informan sobre el porcentaje de cada uno de los componentes minerales y cómo van cambiando a través del tiempo. Además, el microanálisis con EDX del ESEM presenta varias ventajas: *a*) se realiza *in situ, b*) es cuantitativo (a diferencia de otras técnicas que son cualitativas) y *c*) es específico para cada zona del hueso (cortical y callo óseo).

Material y métodos

Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar, adultas, con peso en el rango de 300 a 400 g. Las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico (tres en cada caja) a 22 ± 2°C, humedad y luz controladas (12 × 12 h). Se utilizaron sujetos con dicho peso porque se consideran animales adultos jóvenes que ya habían alcanzado su desarrollo óseo máximo, y sólo machos, para evitar algún efecto del ciclo estral. Los animales fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-98, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se aplicó una dosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg) intraperitonealmente. Se rasuró la pata derecha desde la articulación tibio-tarsal hasta la cadera, y se hizo incisión longitudinal de piel y músculos. Se colocaron separadores hasta exponer el hueso para realizar la fractura. El trazo de la fractura se realizó en la parte central de la diáfisis tibial con segueta de joyero, procurando no lesionar los tejidos blandos. Luego se introdujo alambre Kirschner (0.35 mm de diámetro), se unieron los fragmentos de la tibia (proximal y distal) para que coincidieran los trazos de corte. Los animales se distribuyeron en grupos de tres; de acuerdo con el día de evolución de la consolidación ósea, se efectuó la eutanasia con bióxido de carbono (CO_2) a los días 0 (testigo), 7, 14, 21 y 28 días. Se obtuvieron las tibias y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) durante tres horas, y se lavaron cuatro veces con el mismo amortiguador, durante cinco minutos cada uno. Se cortó un fragmento de 1 cm de longitud, de manera que abarcara la zona de fractura, y después se realizó un corte longitudinal para exponer el hueso cortical y callo óseo. Algunos de los fragmentos se lijaron para obtener una superficie lisa y otros no se lijaron dejando una superficie rugosa, después se secaron a 37°C por 72 horas. Para obtener mejor imagen, las muestras se observaron en el microscopio

mode. The chemical elements analyzed were: carbon (C), calcium (Ca^{++}), phosphorous (P), sodium (Na^{+}) and magnesium (Mg^{++}); from these, C is considered as the major component of the biological samples. Distribution of chemical elements in bone was also performed with mapping software integrated to the EDX in the low vacuum mode.

Data obtained from the different operation modes were analyzed with descriptive statistics and variation coefficients were applied. The ANOVA test was also used to compare chemical element percentages during the osseous consolidation process using the statistical package SPSS for Windows version 10.0.

Results

Bone topography was observed better in high vacuum with retro-dispersed electrons than in low vacuum. Cortical bone and osseous callus were clearly distinguished, with zones without ossification (darker areas) on day 21 of the osseous consolidation (Figure 1A). Regarding image from low vacuum mode, calcified and non-calcified zones cannot be differentiated (Figure 1B).

Considering that, the bone has a low quantity of water (5%) regarding other tissues, it was observed in low vacuum at maximum pressure of 0.5 Torr and in environmental mode the pressure used was approximately 2.3 Torr. In contrast with high humidity samples that require a 5.5 Torr pressure.

Working conditions for the chemical analyses done with the EDX were: 30 Kv, 5 of spot, 10% death time, 200 live seconds, 10 mm working distance and 2 200 counts per minute (CPM). However, because counts went down around 350 CPM when assessment was done for the rough zone, the spot increased to 5.3. Pressure was the same for all chemical analyses in low vacuum (0.5 Torr) and environmental (2.3 Torr) modes.

In the smooth and rough areas of bone analyzed with EDX in high vacuum, it was found that in the rough areas the Ca^{++} (20.7%) and P (10.9%) percentages were statistically significant ($P \leq 0.05$). Meanwhile, Na^{+} and Mg^{++} percentages remained constant (Figure 2).

When sample was observed in high vacuum for a long time the bone got charged. During the chemical analysis and the Ca^{++} and P percentages, 41% and 22.9% decreases were seen, respectively. On the contrary, elements with lower concentrations increased, 31% for Mg^{++} and 135% for Na^{+} when compared to non-charged bone. All measures were statistically significant ($P \leq 0.05$) (Figure 3).

The low vacuum mode differed form the high vacuum mode since Ca^{++}, P and C increased in the smooth zone ($P \leq 0.05$), which did not occur for the

electrónico de barrido ambiental* en modo alto vacío (con electrones secundarios y electrones retrodispersados), en modo bajo vacío y en modo ambiental (con electrones secundarios gaseosos).

El ESEM está equipado con un dispersor de rayos X** para la cuantificación de elementos químicos. Se realizaron cinco análisis en un patrón cruzado en el hueso cortical y callo óseo. La determinación se realizó de manera semicuantitativa en modo alto vacío (en hueso cargado y no cargado) en modos bajo vacío y ambiental. Los elementos químicos analizados fueron: carbono (C), calcio (Ca^{++}), fósforo (P), sodio (Na^{+}) y magnesio (Mg^{++}), de los cuales el C es considerado componente mayoritario de las muestras biológicas. También se realizó la distribución de los elementos químicos en el hueso, con un software de mapeo integrado al EDX en modo bajo vacío.

Los datos obtenidos de los diferentes modos de operación fueron analizados con estadística descriptiva y se aplicaron coeficientes de variación. También se aplicó ANDEVA para comparar los porcentajes de elementos químicos durante el proceso de la consolidación ósea, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows versión 10.0.

Resultados

La topografía del hueso se observó mejor en alto vacío con electrones retrodispersados que en bajo vacío; se distinguió claramente el hueso cortical y el callo óseo, en el cual aún hay zonas sin osificar (áreas más oscuras) el día 21 del proceso de consolidación ósea (Figura 1A). En el caso de la imagen de bajo vacío no se distingue entre zonas calcificadas y no calcificadas en el callo óseo (Figura 1B).

Considerando que el hueso contiene baja cantidad de agua (5%), a diferencia de otros tejidos, se observó en bajo vacío a presión máxima de 0.5 Torr y en modo ambiental se utilizó una presión de aproximadamente 2.3 Torr; a diferencia de las muestras con alto contenido de humedad, que requieren una presión de 5.5 Torr.

Las condiciones de trabajo en los análisis químicos realizados con el EDX fueron: 30 Kv, 5 de spot, 10% de tiempo muerto, 200 segundos vivos, 10 mm de distancia de trabajo y 2 200 cuentas por minuto (CPM). Sin embargo, al realizar las determinaciones en la zona rugosa, las cuentas bajaron alrededor de 350 CPM, por lo que se incrementó el spot a 5.3. La presión fue la misma para todos los análisis químicos en bajo vacío (0.5 Torr) y modo ambiental (2.3 Torr).

En el hueso analizado con el EDX en alto vacío en las zonas lisas y rugosas, se encontró que en las zonas

*XL-30, Philips Electronics, Holanda.
**EDAX-New XL-30, Estados Unidos de América.

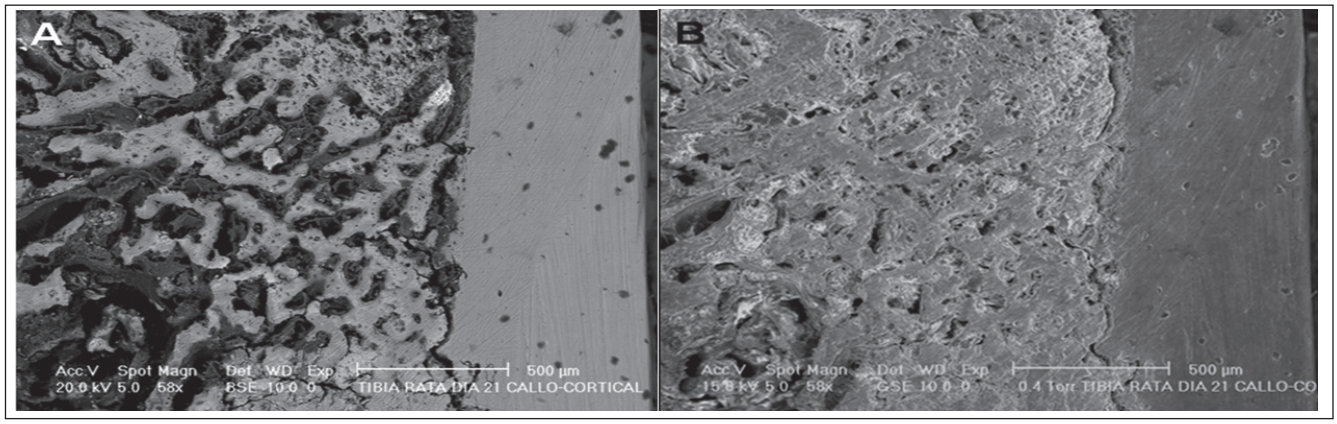

Figura 1: A) Imagen con electrones retrodispersados en modo alto vacío; se diferencia el hueso cortical y callo óseo con zonas brillantes y zonas más oscuras. B) Misma imagen con electrones secundarios gaseosos en modo bajo vacío.

Figure 1: A) Image with retro-dispersed electrons in high vacuum mode; cortical bone and osseous callus with brilliant and darker zones are differenced. B) Same image with gaseous secondary electrons in low vacuum mode.

minority elements. When the means of the percentages of these ions in low vacuum and environmental modes were compared, significant changes were found for the C, Ca^{++}, P and Fe^{+} percentages. Significant differences were only observed for P when the high vacuum and environmental groups were compared, as long as the sample was not charged (Figure 2). However, the most trustful percentages of chemical elements were obtained, with the variation coefficients, for C and Ca^{++} in low vacuum, for P in high vacuum and Mg^{++}, Na^{+}, K^{+} and Fe^{+} in the environmental mode (Table 1).

Since Mg^{++}, Na^{+}, K^{+} and Fe^{+} showed less variability and are hard to quantify due to fact that their concentrations are lower than 1%, it was decided that the element analyses were done in the environmental mode during the osseous consolidation.

The mapping was done in the environmental mode to demonstrate chemical element distribution. Calcium and phosphorus showed a dense and homogenous distribution in the cortical region, while magnesium and zinc presented a scarce and heterogeneous distribution, which agrees with those concentrations found by the EDX. In the osseous callus all elements had distributions similar to the aforementioned. However, non-calcified zones were observed because the bone used for mapping was from a rat with 28 days of consolidation (Figure 4).

During the osseous consolidation process the cortical calcium percentages showed a significant decrease of 6.3% from day 0 to 14 of evolution ($P \leq 0.05$). From day 21 to 28 Ca^{++} concentrations dropped again to 3.9% and 11.15%, respectively, regarding the control group. Even though the calcified osseous callus appears towards day 14, when calcium levels were elevated regarding days 21 and 28, those levels were never higher than on day 0. Phosphorus significantly dropped 11.5% from day 0 to 7 in the cortical bone

rugosas el porcentaje de Ca^{++} (20.7%) y P (10.9%) bajaron y fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$), mientras que los porcentaje de Na^{+} y Mg^{++} permanecieron constantes (Figura 2).

Al observar la muestra en alto vacío por tiempo prolongado, el hueso se cargaba; durante el análisis químico y el porcentaje de Ca^{++} y P, se observó disminución de 41% y 22.9%, respectivamente, en cambio los elementos de menor concentración incrementaron 31% el Mg^{++} y 135% el Na^{+}, en el hueso cargado, en comparación con el hueso no cargado; todas las medias fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) (Figura 3).

En el modo de bajo vacío, a diferencia del de alto vacío, en la zona lisa se observó que el Ca^{++}, P y C incrementaron ($P \leq 0.05$), lo que no ocurre con los elementos minoritarios. Al comparar las medias de los porcentajes de estos iones en bajo vacío y modo ambiental, se encontraron cambios significativos en los porcentajes de C, Ca^{++}, P y Fe^{+}; al comparar los promedios de los grupos de alto vacío con modo ambiental se encontró que sólo hubo diferencias con el P, siempre y cuando la muestra no presentara carga (Figura 2). Sin embargo, con los coeficientes de variación los porcentajes de elementos químicos más confiables se obtuvieron en bajo vacío para C y Ca^{++}, en alto vacío para P y en modo ambiental para Mg^{++}, Na^{+}, K^{+} y Fe^{+} (Cuadro 1).

Según los resultados, se decidió que durante el proceso de consolidación ósea, los análisis de elementos se realizaran en modo ambiental, pues el Mg++, Na+, K+ y Fe+ presentaron menor variabilidad y son difíciles de cuantificar por sus concentraciones menores a 1%.

Para demostrar la distribución de los elementos químicos se realizó el mapeo en modo ambiental. El calcio y el fósforo presentaron distribución densa

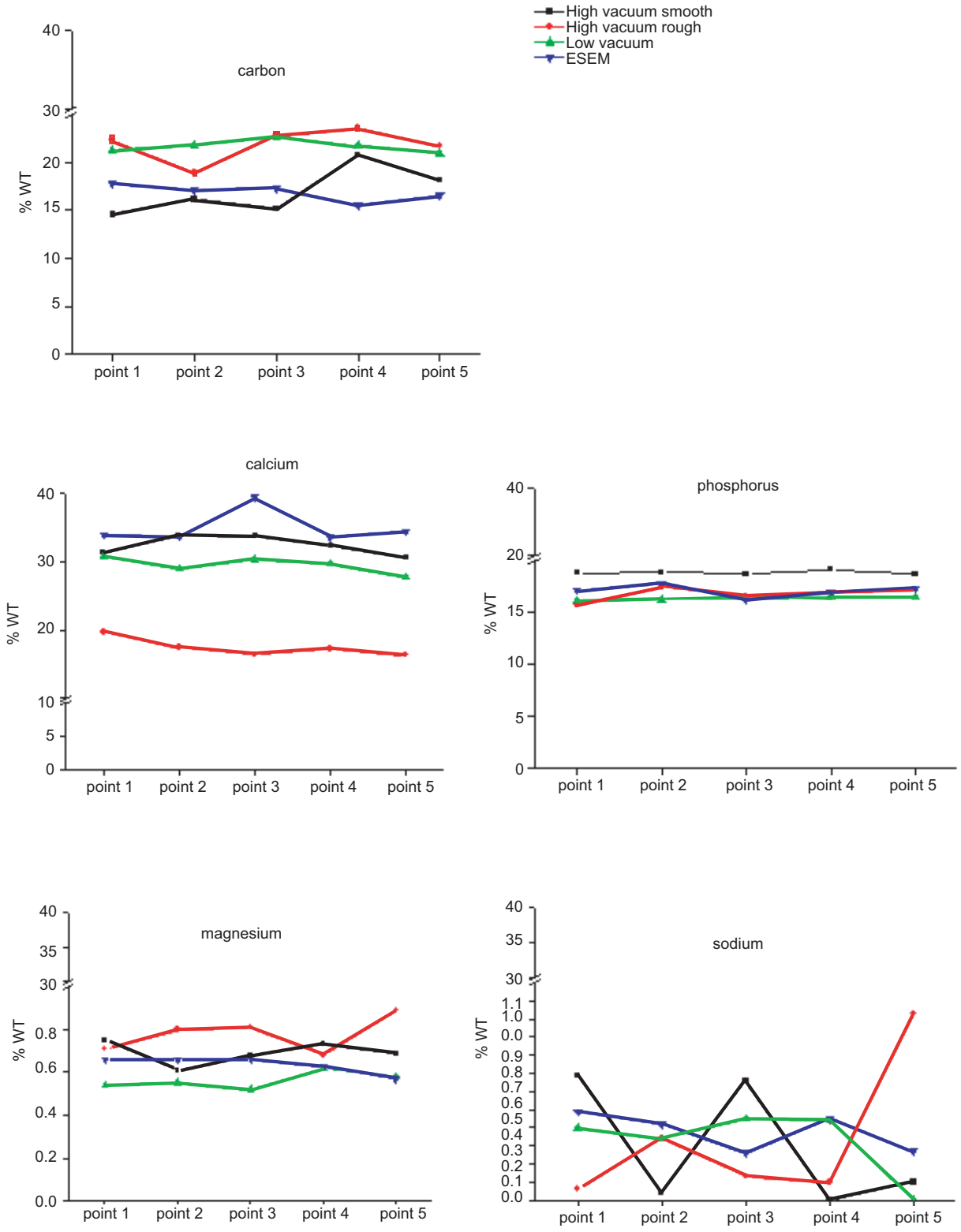

Figura 2: Determinación de elementos químicos en el hueso cortical de tibia de rata, en los diferentes modos de operación del microscopio electrónico de barrido ambiental (n = 5). Se observa que el modo ambiental es el mejor, debido a que los elementos traza presentan menor variabilidad.

Figure 2: Chemical element assessment in the cortical bone of the rat tibia by the different operation modes of the environmental scanning electron microscope (n = 5). It can be observed that the environmental mode is the best because the trace elements show less variability.

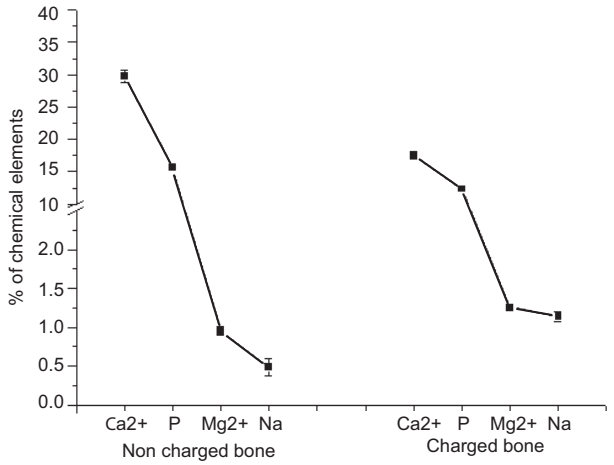

Figura 3: Porcentaje de elementos químicos de hueso cortical de tibia de rata observada en alto vacío, en la cual el hueso se carga y disminuye el número de cuentas por minuto. Todas las medias son significativamente diferentes (n = 45).

Figure 3: Chemical element percentage from cortical bone of the rat tibia observed in high vacuum, in which the bone is charged and the number of counts per minute decreases. All means are significantly different (n = 45).

($P \leq 0.05$), while there is a slight increase in the cortical bone and osseous callus during the following days (14-28). Cortical calcium and phosphorus percentages were significantly correlated when in basal levels on day 0 ($r = 0.493$, $P \leq 0.05$). This correlation was lost from day 7 to 14 and regained towards days 21 to 28 ($r = 0.725$, $P \leq 0.05$). A 2:1 relation was found according to the calcium and phosphorus percentages assessed both in cortical bone and in osseous callus during all the osseous consolidation process. Regarding magnesium, in the cortical region and the osseous callus had a very important increase from day 0 to 14 ($P \leq 0.05$) and dramatically fell on days 21 to 28 ($P \leq 0.05$) down to basal levels. Cortical sodium steadily increased from basal levels until day 28 ($P \leq 0.05$). In the osseous callus the percentage increased between days 14 to 21; it decreased towards day 28 regarding its same group ($P \leq 0.05$), but it was higher than the control group (Figure 5).

Discussion

Low-energy secondary electrons (≤ 50 eV) emitted by the sample, are the ones more commonly used for morphological studies of biological specimens. They practically do not yield information about their composition though, and the quantity that reaches detector depends on the surface morphology of the object and the angle between this surface and the beam.[5] However, the best bone image was seen with retro-dispersed electrons (of high energy ≥ 50 eV) in high vacuum, as long as the sample was not charged during image obtainment. One of the advantages of images with

y homogénea en la región cortical, mientras que el magnesio, el sodio y el zinc presentaron distribución escasa y heterogénea, lo cual concuerda con las concentraciones encontradas con el EDX. En el callo óseo todos presentaron distribución similar a los anteriores; sin embargo, se observaron zonas no calcificadas debido a que el hueso utilizado para el mapeo fue de una rata de 28 días de consolidación ósea (Figura 4).

En el proceso de consolidación ósea los porcentajes de calcio cortical del día 0 al 14 de evolución, presentaron baja significativa de 6.3% ($P \leq 0.05$), y del día 21 al 28 vuelve a bajar la concentración a 3.9% y 11.15%, respectivamente, en relación con el grupo testigo. En tanto que el callo óseo calcificado aparece hacia el día 14, cuando los niveles de calcio fueron elevados, comparativamente con los días 21 y 28, pero nunca fueron mayores al del día 0. El fósforo de 0 a 7 días baja significativamente 11.5% ($P \leq 0.05$) en el hueso cortical. En tanto que en los días posteriores (14-28) hay ligero aumento en hueso cortical y callo óseo. En el nivel basal (día 0), los porcentajes de calcio y fósforo corticales correlacionaron significativamente ($r = 0.493$, $P \leq 0.05$), pero la correlación se pierde del día 7 al 14, y se recupera hacia los días 21 y 28 ($r = 0.725$, $P \leq 0.05$). De acuerdo con los porcentajes determinados de calcio y fósforo, se encontró una relación 2:1, tanto en hueso cortical como en callo óseo, durante todo el proceso de la consolidación ósea. En cuanto al magnesio, en la región cortical sufrió incremento muy importante del día 0 al 14 ($P \leq 0.05$) y bajó drásticamente desde el día 21 al 28 ($P \leq 0.05$) a niveles basales, lo mismo ocurrió en callo óseo. El sodio cortical subió de manera sostenida desde el nivel basal hasta el día 28 ($P \leq 0.05$). En el callo óseo el porcentaje incrementó entre los días 14 y 21, para el día 28 disminuyó su porcentaje con respecto a su mismo grupo ($P \leq 0.05$), pero fue mayor que el grupo testigo (Figura 5).

Discusión

Los electrones secundarios de baja energía (≤ 50 eV), emitidos por la muestra, son los que se utilizan más comúnmente para los estudios morfológicos de los especímenes biológicos, pero prácticamente no proporcionan información de su composición, y la cantidad de electrones que llegan al detector depende de la morfología de la superficie del objeto y del ángulo entre esa superficie y el haz.[5] Sin embargo, la mejor imagen de hueso la obtuvimos con electrones retrodispersados (de alta energía ≥ 50 eV) en alto vacío, siempre y cuando la muestra no se cargue durante la obtención de la imagen. Una de las ventajas de las imágenes con electrones retrodispersados en alto vacío es que pueden dar información sobre la composición atómica de la región en estudio,[13] lo cual es impor-

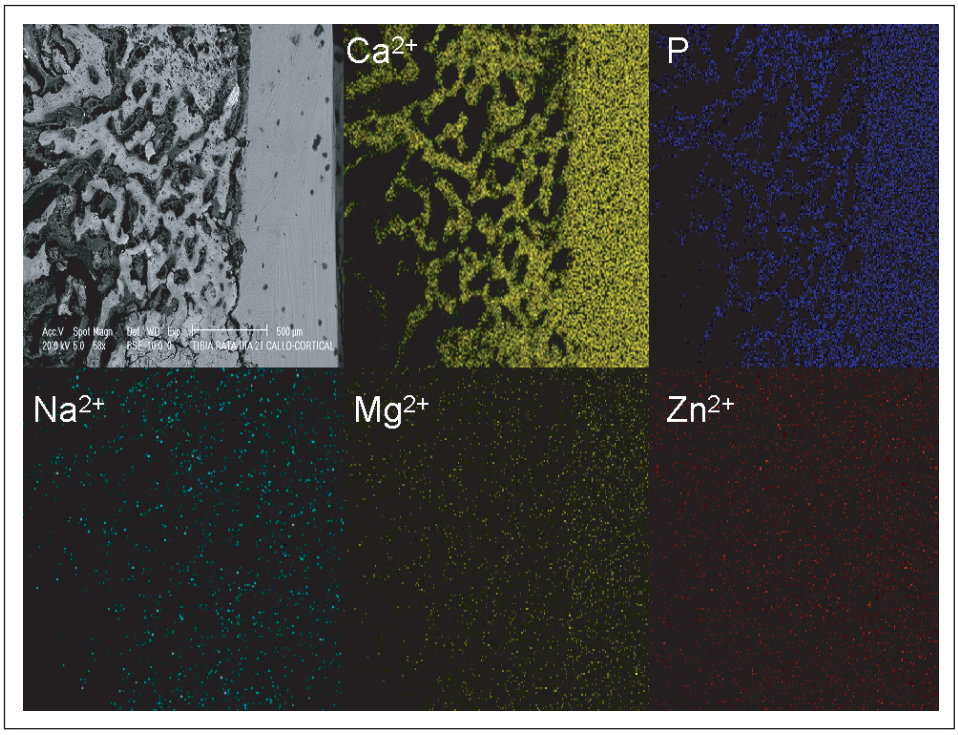

Figura 4: Imagen de la distribución de elementos químicos en modo ambiental en la tibia de rata a los 21 días del proceso de consolidación ósea. El Ca++ y P presentaron distribución densa y homogénea en la cortical, en el callo óseo se observan zonas no calcificadas.

Figure 4: Image of the chemical element distributions in the environmental mode in the rat tibia at 21 days of the osseous consolidation process. Ca++ and P showed dense and homogeneous distribution in the cortical area, non-calcified zones are observed in the osseous callus.

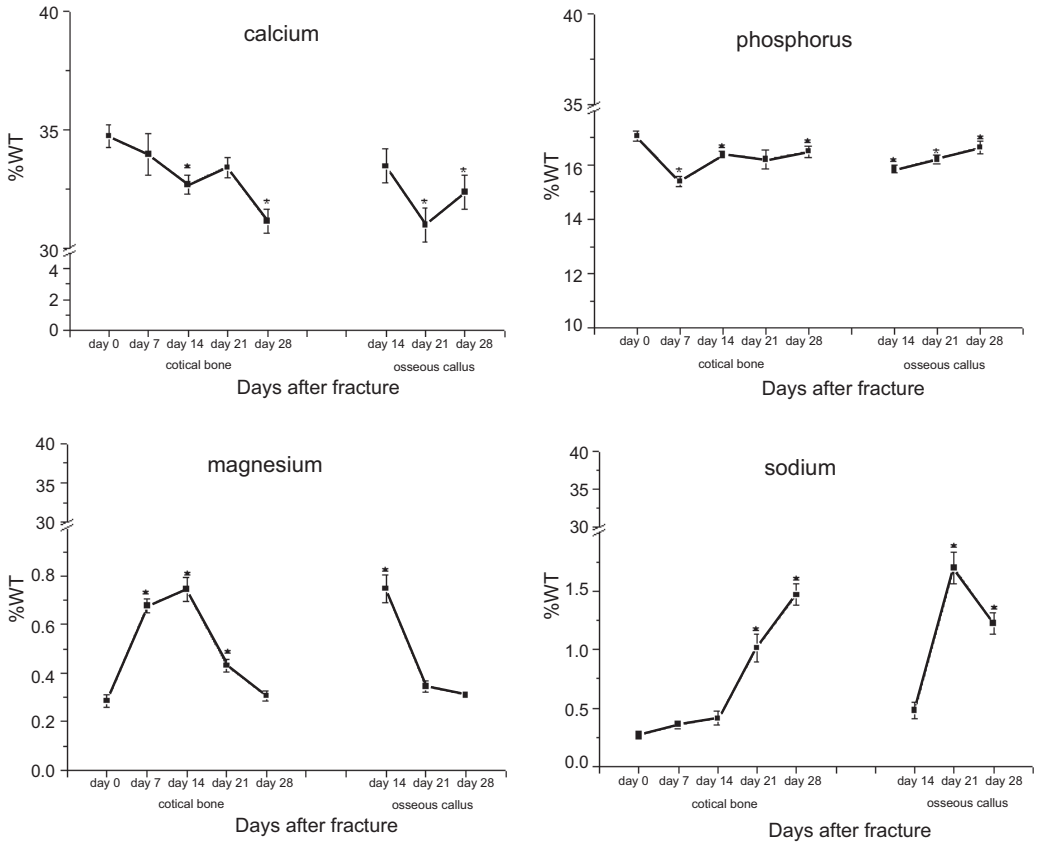

Figura 5: Porcentajes de elementos químicos determinados por EDX, en tibia de rata, para determinar el comportamiento de los elementos durante la consolidación ósea.

Figure 5: Chemical element percentages assessed by EDX in rat tibia to determine the behavior of chemical elements during osseous consolidation.

retro-dispersed electrons in high vacuum, is that they yield information about the atomic composition of the studied region;[13] which is very important to differentiate the evolution of osseous callus and cortical bone during osseous consolidation. Furthermore, detector for gaseous secondary electrons in the environmental mode does not allow having an ample observation field, as it happens in the high and low vacuum modes. The image observed in low vacuum showed a little charge, because it has a low pressure (1.0 Torr maximum) to eliminate such effect. The aforementioned does not happen in the image obtained by the environmental mode, despite the fact that the sample was kept in the chamber for a long time.

Chemical element quantification in bone was done by the three operation modes: high vacuum, low vacuum and environmental, in order to determinate the most suitable. Chemical analysis by EDX varies according to the observation mode for several reasons: *a*) because it depends on sample conductivity, conductive samples can be studied in high vacuum, low-conductive samples in low vacuum and non-conductive samples in environmental, such as biological ones, due to the use of a detector for gaseous secondary electrons that avoids charge artifact. Avoiding this artifact has beneficial effects on X-rays analysis, since the conductive cover applied to the sample affects the characteristic spectrum of the chemical elements;[14,15] *b*) the angle produced by the X-ray beam must be constant for smooth surfaces, since the rough surfaces affect repeatability of results;[16] *c*) quantification of the charged sample decreased the Ca^{++} percentage in 41% and P percentage in 20%. On the other hand, Mg^{++} and Na^{+} reached 133% and 230%, respectively, due to local variations in the secondary electron emission and in primary beam deflexion caused by the charge; both interfere with specter and image obtaining.[14,17] After doing the chemical analysis by the three operation modes, it was determined that the best way to apply them on bone is the environmental mode. Repeatability is not that accurate in the other modes when it is considered that the variation coefficients were lower for the trace elements (Na^{+}, Mg^{++}, K and Fe^{+}) and their concentrations are lower than 1%, despite the variation coefficients of the major elements in low vacuum: Ca^{++} (r = 1.7), P (r = 0.9) and high vacuum: Ca^{++} (r = 2.0), P (r = 0.8).

Application of chemical element mapping is useful to prove how calcium and phosphorus distribution is done in the osseous callus, compared to the cortical bone in which there is a dense homogeneous distribution, while in the callus there are zones non-ossified yet, because the osseous consolidation process is still unfinished.[18]

The osseous consolidation model in rat has been

tante para diferenciar la evolución del callo óseo y hueso cortical durante el proceso de la consolidación ósea. Además, el detector de electrones secundarios gaseosos en modo ambiental no permite tener un campo de observación amplio como sucede en alto y bajo vacío. La imagen que se observó en bajo vacío presentó un poco de carga, debido a que es una presión baja (máximo 1.0 Torr) para eliminar tal efecto. Lo anterior no sucede en la imagen que se obtuvo en modo ambiental, a pesar de que la muestra se mantuvo en la cámara por tiempo prolongado.

La cuantificación de elementos químicos en el hueso se realizó en los tres modos de operación: alto vacío, bajo vacío y ambiental, para determinar el más adecuado. El análisis químico con el EDX varía según el modo de observación por varias razones: *a*) Porque depende de la conductividad de la muestra, en alto vacío se pueden estudiar muestras conductoras, en bajo vacío muestras poco conductoras y en modo ambiental muestras no conductoras, como las biológicas, debido a la utilización de un detector de electrones secundarios gaseosos que evita el artefacto de carga, lo cual tiene efectos benéficos sobre el análisis con rayos X, ya que la cubierta conductora aplicada a la muestra afecta el espectro característico de los elementos químicos;[14,15] *b*) las superficies lisas se requieren para mantener el ángulo constante de los rayos X producido por el haz de electrones, puesto que las superficies rugosas afectan la reproducibilidad de los resultados;[16] *c*) cuando se realizó el análisis químico en la muestra cargada y no cargada, la cuantificación en la muestra cargada disminuyó el porcentaje de Ca^{++} en 41% y de P en 20%. En cambio el Mg^{++} y el Na^{+} llegaron a 133% y 230%, respectivamente. Esto último se debe a que la carga induce variaciones locales en la emisión de los electrones secundarios y en la deflexión del haz primario, ambos interfieren con la obtención del espectro y de la imagen.[14,17] Después de haber realizado el análisis químico en los tres modos de operación, se determinó que la mejor manera para realizarlos en hueso es en modo ambiental. Al considerar que los coeficientes de variación fueron menores para los elementos traza (Na^{+}, Mg^{++}, K y Fe^{+}) y su concentración es menor a 1%, la reproducibilidad no es tan precisa en los otros modos, a pesar de que los elementos mayoritarios presentaron coeficientes de variación menores en bajo vacío: Ca^{++} (r = 1.7), P (r = 0.9) y alto vacío: Ca^{++} (r = 2.0), P (r = 0.8).

La aplicación del mapeo de elementos químicos es útil para demostrar cómo se efectúa la distribución del calcio y fósforo en el callo óseo, en comparación con el hueso cortical en el que hay una distribución densa y homogénea, mientras que en el callo hay zonas aún sin osificar, debido a que no ha terminado el proceso de la consolidación ósea.[18]

studied by osseous densitometry and chemical element determination in blood.[19,20] However, there are no studies *in situ* that indicate the behavior of osseous ions (calcium, phosphorus, magnesium and sodium) during the osseous consolidation process in the cortical region and osseous callus.

Information documented in literature for this model points out that serum calcium concentration increases significantly regarding the control group (22%-38%) on days 7, 12, 21 and 30 after the tibial fracture in the rat.[20] It was found in this study that Ca++ decreases during the consolidation process in the cortical bone and osseous callus.

It has been demonstrated that serum phosphorus concentration increases only on days 7 and 12 (24% and 34% respectively) after fracture.[20] In this study P dropped during the first seven days in the cortical bone after fracture. There was a slight increase on the following days in the cortical bone and osseous callus, but never were higher than in the control group. Decrease in Ca^{++} and P percentages was found because of the osseous repairing process that elevates both ion concentrations in serum, and correlates with the aforementioned.[20]

There is also a significant correlation between calcium and phosphorus on day 0 that is reestablished when osseous consolidation is in an advanced phase (days 21 and 28) in a 2:1 ratio. Ca^{++}/P relationship for diaphysis of the adult rat varies from 1.86 to 1.88 in totally consolidated bone. Therefore, data from the EDX of the ESEM are trustful to perform experimentally studies on osseous consolidation and osteoporosis.[21]

Besides the presence of major elements, the presence of other elements in the osseous metabolism and that are not part of the crystalline structure of the hydroxyapatite, such as magnesium and sodium. Mg increased during the first 14 days and dramatically dropped until day 28 down to basal levels in both zones. On the contrary, sodium in cortical bone steadily increased from basal levels until day 28, and in the osseous callus the percentage also increased during the first days (14 and 21) and decreased by day 28. However, proportion and participation of these elements in the metabolism and osseous consolidation are not clearly defined in literature. It is known that magnesium is the fourth most abundant cation of the organism and once it is absorbed, it is transported to several tissues: bone is the one where it is found in a major proportion, located in hydroxyapatite crystals.

According to experimental studies, it has been suggested that magnesium dropping causes increase in osseous resorption or inadequate osseous remodeling; Mg deficiency is associated to osteoporosis.[22-24] Sodium is the most abundant cation in the extracellular fluid,

El modelo de la consolidación ósea en rata se ha estudiado por densitometría ósea y determinación de elementos químicos en sangre.[19,20] Sin embargo, no hay estudios *in situ* que indiquen el comportamiento de los iones óseos (calcio, fósforo, magnesio y sodio) durante el proceso de la consolidación ósea en la región cortical y callo óseo.

La información documentada en la bibliografía para este modelo indica que la concentración de calcio sérico incrementa de manera significativa con respecto al grupo testigo (22%-38%) durante los días 7, 12, 21 y 30, después de una fractura en la tibia de rata.[20] En este estudio se encontró disminución de Ca^{++} durante el proceso de consolidación en el hueso cortical y callo óseo.

Se ha demostrado que la concentración de fósforo en sangre aumenta sólo a los 7 y 12 días (24% y 34%, respectivamente) después de una fractura.[20] En este trabajo se encontró que el porcentaje de P disminuyó en los primeros siete días de la fractura en el hueso cortical. En los días subsiguientes hubo ligero incremento en hueso cortical y callo óseo, pero nunca fueron mayores que el testigo. La disminución del porcentaje de Ca^{++} y P que se encontró se debió al proceso de la reparación ósea, lo cual provoca que la concentración de ambos iones incremente en sangre, y correlaciona con lo antes mencionado.[20]

También hay correlación significativa de calcio y fósforo el día 0, que se restablece cuando la consolidación ósea está en fase avanzada (días 21 y 28), en proporción 2:1; la relación Ca^{++}/P para diáfisis de rata adulta, varía de 1.86 a 1.88 en hueso totalmente consolidado; por tanto, los datos obtenidos con el EDX del microscopio electrónico de barrido ambiental son confiables para realizar experimentalmente estudios de consolidación ósea y osteoporosis.[21]

Además de los elementos mayoritarios, se informa presencia de otros elementos en el metabolismo óseo y no son parte de la estructura cristalina de la hidroxiapatita, como el magnesio y el sodio. De éstos, el primero incrementó en los primeros 14 días y bajó drásticamente hasta el día 28, a niveles basales en ambas zonas. En cambio, el sodio en el hueso cortical subió de manera sostenida desde el nivel basal hasta el día 28, y en el callo óseo el porcentaje también aumentó en los primeros días (14 y 21) y bajó el día 28. Sin embargo, la proporción y participación de estos elementos en el metabolismo y consolidación ósea no están bien definidos en la literatura. Se sabe que el magnesio es el cuarto catión más abundante del organismo y una vez absorbido, es transportado a diferentes tejidos: el óseo es donde se encuentra en mayor proporción, y se ubica en los cristales de hidroxiapatita.

De acuerdo con estudios experimentales se ha

interacts with other electrolytes to regulate osmotic pressure and maintain hydric balance. It has been found in humans that loss of osseous calcium is proportional to salt intake. Furthermore, there is a negative correlation between sodium intake and osseous mineral density. However, the mechanism that elevates osseous resorption because of the salt is not known.[25,26] Literature reports agree with the results of the present study, since sodium levels increased along with osseous consolidation and decreased during the whole process, working as antagonists.[25,27,28]

The calcified osseous callus appeared until day 14 according to the evolution of the tibial fracture. Before that day, It was only fibrous material[29] in which no mineral deposits were observed. The fact that calcium and phosphorus levels were close to basal levels towards day 28 is explained because consolidation is completed by day.[20,30]

The conclusion is that ESEM use in this model was adequate, since it allows observing osseous callus evolution and fracture repair. However, its application in orthopedics is limited because a biopsy is needed to determine osseous pathologies. Diagnosis of some of these diseases can be done by non-invasive methods (osseous densitometry and computed axial tomography).

Acknowledgements

Dr. Saul Renan Leon Hernandez is thanked for his assistance in the statistical analysis of the data; and Lic. D. G. Miguel Angel Gonzalez Ocampo for his help on the photographic work.

Referencias

1. Danilatos GD. Foundation of environmental scanning electron microscopy. Adv Electron Phys 1988; 71:109-250.
2. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Roming AD, Lyman CE *et al.* Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1992.
3. Hayat MA. Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological aplications. New York: Van Nostrand Reinhold Co, 1978.
4. Yamada N, Nagato M, Murakami S, Ikeuchi M, Oho E, Baba N *et al.* Preparation for observation on the fine structure of biological specimens by high resolution SEM. J Electron Micros 1983; 32:321-330.
5. Vázquez Nin G, Echeverría O. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México D F: Fondo de Cultura Económica, 2000.
6. Danilatos GD. Enviromental scanning electron microscopy and microanalysis. Mikrochim Acta 1994; 114/115:143-155.
7. Tai SS, Tang XM. Manipulating biological samples for enviromental scanning electron microscopy observation. Scanning 2001; 23:267-272.
8. Danilatos GD. Introduction to the ESEM instrument. Microsc Res Tech 1993; 25:354-361.
9. Boyd AS, Seger O, Vannucci S, Langley M, Abraham JL. Exposición al mercurio y enfermedades cutáneas. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 81-90.
10. Ligon JJ, Abraham JL, Boyd AS. Traumatic osmium tetroxide inoculation. J Am Acad Dermatol 2001; 45:949-952.
11. Schwille PO, Schmiedl A, Hermann U, Fan J, Gottieb D, Manoharam M *et al.* Magnesium, citrate magnesium and magnesium-alkali citrate as modulators of calcium oxalate crystallization in urine: Observation in patients with recurrent idiopathic calcium urolithiasis. Urol Res 1999; 27:117-126.
12. McMenanin PG, Djano J, Welthall R. Griffin BJ. Char-

sugerido que la disminución de magnesio produce aumento de la resorción ósea, o bien inadecuada remodelación ósea, y su deficiencia está asociada con osteoporosis.[22-24] El sodio es el catión que más abunda en el líquido extracelular, actúa con otros electrólitos, para regular la presión osmótica y mantener el equilibrio hídrico. En humanos se ha hallado que la pérdida de calcio óseo es proporcional al consumo de sal, además hay correlación negativa entre el consumo de sodio y la densidad mineral ósea. Sin embargo, el mecanismo que incrementa la resorción ósea inducida por la sal no se conoce.[25,26] La información documentada en la literatura coincide con los resultados del presente trabajo, ya que los niveles de sodio incrementaron con la consolidación ósea y el Ca^{++} disminuyó durante todo el proceso, funcionando como antagonistas.[25,27,28]

De acuerdo con la evolución de la fractura en la tibia, el callo óseo calcificado apareció hasta el día 14, antes era únicamente material fibrilar,[29] en el cual no se observaron depósitos de minerales. A los 30 días hay consolidación total;[20,30] por tanto, los niveles de calcio y fósforo, a los 28 días en este caso, se acercaron a los valores basales.

En conclusión, el uso del ESEM en este modelo resultó adecuado, pues permite ver la evolución del callo óseo y la reparación de la fractura. Sin embargo, su aplicación en ortopedia es limitada, por necesitarse una biopsia para determinar patologías óseas. El diagnóstico de algunas de estas enfermedades se puede hacer mediante métodos no invasivos (densitometría ósea y tomografía axial computada).

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Saúl Renán León Hernández su apoyo en el análisis estadístico de los datos; y al Lic. D. G. Miguel Ángel González Ocampo su apoyo en el trabajo fotográfico.

acterization of the macrophages associated with the tunica vasculosa lentis of the rat eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; 43:2076-2082.
13. Donald AM. The use of enviromental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials. Nature Mater 2003; 2:511-516.
14. Griffin BJ, Suvorova AA. Charge-related problems associated with X-ray microanalysis in the variable pressure scanning electron microscope at low pressures. Microsc Microanal 2003; 9:155-165.
15. Tang X, Joy DC. Quantitative measurements of charging in a gaseous environment. Scanning 2003; 25:194-200.
16. Timofeeff NM, Lowenstein KT, Blackburn HW. ESEM-EDS: an improved technique for major element chemical analysis of fluid inclusions. Chem Geol 2000; 164:171-182.
17. Reid AP, Oates K, Potes WTW. The effects of aluminum coating on elemental signals in X-ray microanalysis. Micros Res Tech 1993; 24:168-172.
18. Villegas CH, Mayon GJ, González MG, González JM, Ibarra MG, Murillo UA. Estudio de la osteoporosis y osteopenia por medio de radiología, densitometría, morfometría, microscopía de barrido en la tercera vértebra lumbar en una muestra de hombres y mujeres en la Ciudad de México. Ginecol Obstet Méx 1998; 66: 187-201.
19. Quintana-Armenta A, Ruiz-Rosano L, Valdez MR, Diez GP, Isoard AF, Herrero BB *et al.* Medición del contenido mineral óseo en las vértebras lumbares L2-L5 de ratas Long Evans hembras por absorciometría de rayos X de doble energía y por análisis químico. Acta Ortop Mex 2003; 17:168-172.
20. Diez GM, Chávez AD, Mercado CR, Domínguez HV, Torres MA, Lomelí MP *et al.* Modelo experimental de fracturas y consolidación ósea en ratas. Rev Mex Ortop Traum 2002; 16:113-117.
21. Mendoza-Barrera C, Meléndez LM, García LE, Hernández FC. Caracterización estructural y biointegración del sustituto óseo BioOsteo. Rev Mex Fís 2004; 50:19-23.
22. Rude RK. Magnesium deficiency: a heterogeneous cause of disease in humans. J Bone Miner Res 1998; 13: 749-758.
23. Rude RK, Gruber EH, Wei YL, Frausto A, Mills GB. Magnesium deficiency: Effect on bone and mineral metabolism in the mouse. Calcif Tissue Int 2003; 72:32-41.
24. Rude RK, Gruber EH. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. J Nutr Biochem 2004; 15:710-716.
25. Lietz G, Avenell A, Robins SP. Short-term effects of dietary sodium intake on bone metabolism in postmenopausal women measured using urinary deoxypyridinoline excretion. Br J Nutr 1997; 78:73-82.
26. Lai-Ping E, Swaminathan R. Calcium metabolism and bone calcium content in normal and oophorectomized rats consuming various levels of saline for 12 months. J Nutr 1998; 128:633-639.
27. Chan AY, Poon P, Chan ELP, Fung SLM, Swaminathan R. The effect of high sodium intake on bone mineral content in rats fed normal calcium or low calcium diet. Osteop Int 1992; 3:341-344.
28. Massey LK, Whiting SJ. Dietary salt, urinary calcium and bone loss. J Bone Miner Res 1996; 11:731-736.
29. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. J Orthop Res 1993; 11:305-312.
30. Landry SP, Marino AA, Sadasivan KK, Albright AJ. Bone injury response. Clin Orthop 1996; 332:260-273.