

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* EM
ENSAIOS BIOLÓGICOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E
REPARO ÓSSEO**

DÊNISON PEREIRA DA SILVA

**ARACAJU
Junho / 2010**

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* EM
ENSAIOS BIOLÓGICOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E
REPARO ÓSSEO**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração de Saúde e Ambiente.

DÊNISON PEREIRA DA SILVA

Orientadores: Prof^a. Sonia Oliveira Lima, D.S.c.

Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.S.c.

**ARACAJU
Junho / 2010**

S586u Silva, Dênison Pereira da.

Utilização de otólitos de cynoscion acoupa em ensaios biológicos de biocompatibilidade e reparo ósseo / Dênison Pereira da Silva; orientadores: Sonia Oliveira Lima, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior. – Aracaju: 2010. 66 f.: il.

Inclui bibliografias

Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental). – Universidade Tiradentes1-
Tecido ósseo. 2. Regeneração óssea. 3. Biominerais e regeneração óssea. 4. Pescada amarela. 5. Otólitos I. Lima, Sonia Oliveira (Orient.). II. Albuquerque Junior, Ricardo Luiz Cavalcanti (Orient.). III. Título

CDU: 614:504

UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E REPARO ÓSSEO

DÊNISON PEREIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovado por:

D.S.c. Sonia Oliveira Lima
Orientadora

D.S.c. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior
Orientador

D.S.c. Lauro Xavier Filho
Titular

D.S.c. Ericka Janine Dantas da Silveira
Titular - Externo

D.S.c. Cristiane Costa da Cunha Oliveira
Suplente

D.S.c. Juliana Cordeiro Cardoso
Suplente

ARACAJU
Junho / 2010

Dedico esse trabalho ao meu pai celestial, aos meus pais, irmãos em especial a Edinaldo (in memoriam), amigos, a todos que contribuíram de alguma forma nessa jornada e aos meus orientadores por estarem ao meu lado nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu grande Deus por mais esta oportunidade, pela força e a garra a mim atribuída para que pudesse alcançar mais este objetivo. Realmente sou muito abençoado.

Aos meus pais (Lindinalva e Manoel) pela educação e os valores que me ensinaram, carinho e compreensão em todas as etapas e decisões da minha vida; sinto muito orgulho e amor em tê-los.

Aos meus irmãos; aos meus amigos de verdade: (Alisson Gois, Íris Gardênia, Mateus Assis, Simone Regina, Evandra Valéria, Cíntia Guerra e Anabel Rodrigues), pelo incentivo e entendimento quanto a minha ausência, ansiedade e às vezes até impaciência em determinados momentos.

De uma forma especial a Professora Pureza, Coordenadora do curso de enfermagem da Universidade Tiradentes por todas as oportunidades que me proporcionou e as orientações que sigo a cada dia.

Aos meus colegas de turma, de profissão e grandes amigos: Dayse Valido, Simone Otília (especialmente), Elizano Assis, Nívia e Leane pela sinceridade, força, união e encorajamento nesta jornada.

À Sr^a. Zilda e Sr. Paulo Renato pelas orientações constantes, pela amizade e por todos os conselhos; realmente não vejo como teria concluído sem a relevante contribuição.

Aos meus orientadores: Prof^a. Dr^a. Sonia Lima e Prof. Ricardo Luiz Albuquerque que independente de qualquer coisa sempre estiveram dispostos a me direcionar com as melhores idéias e que fez com que eu acreditasse realmente ser capaz (muito obrigado!).

Não posso esquecer-me de constar um agradecimento especial, aliás, muito especial (in memoriam) ao meu amigo e irmão Edinaldo Pereira que partiu precocemente aos 23 anos, deixando para mim muitas formas de aprendizado e valores morais que trago comigo a cada dia, seguramente não seria o mesmo sem você meu irmão (Eu te amo!).

UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE BIOCOMPATIBILIDADE E REPARO ÓSSEO

RESUMO

Otólitos são concreções calcárias presentes no ouvido interno de peixes. Em virtude de serem ricos em minerais considerados essenciais ao processo de mineralização óssea, e de uma matriz protéica a otolina, tem sido sugerido que os otólitos poderiam funcionar como biominerais. Portanto, este estudo objetivou analisar a biocompatibilidade desse produto, bem como a dinâmica da regeneração de defeitos ósseos tratados com preparado gelatinoso estéril de otólitos. Para o ensaio de biocompatibilidade, tubos de polietileno contendo preparado gelatinoso estéril de otólitos foram implantados no lado direito do dorso de 24 ratos *Wistar*, e do lado esquerdo foram implantados tubos contendo apenas colágeno hidrolisado (gelatina inerte). Os animais foram eutanasiados após 3, 7 e 30 dias, o tecido perimplantar foi removido, fixado em formol e processado para inclusão em parafina. Secções histológicas coradas em HE foram obtidas e analisadas em microscopia de luz. Posteriormente, defeitos ósseos artificiais foram realizados no fêmur de 20 ratos *Wistar*, divididos em 02 grupos: grupo controle (CTL), cujos defeitos ósseos não receberam, qualquer tratamento adicional; e grupo experimental (OTL), onde os defeitos foram preenchidos com o preparado de otólitos. Os animais foram eutanasiados 14 dias após os procedimentos cirúrgicos; os fêmures foram removidos e realizadas imagens radiográficas dos defeitos ósseos produzidos nos grupos CTR e OTL. Utilizou-se software ImageTool (UTHSCSA ImageTool, versão 3.0) para as avaliações radiográficas. Posteriormente foram fixados em formalina, descalcificados em ácido nítrico a 0,5% e processados histologicamente. Antes das eutanásias, foram coletadas amostras sanguíneas para avaliações das dosagens séricas de cálcio (Ca) e fosfatase alcalina (ALKP), assim como dos parâmetros hematológicos convencionais (hemograma). No estudo de biocompatibilidade, observou-se um padrão similar de resposta inflamatória no tecido conjuntivo circundinjacente a ambos os implantes, de magnitude variando entre moderada e severa em 3 dias e leve a ausente em 30 dias. Não foram observadas formações granulomatosas ou infiltração aguda persistente ao redor dos implantes. Focos de calcificação distrófica foram evidenciados no tecido perimplantar do tubo com PGO. No estudo de reparo ósseo, as secções histológicas revelaram que o trabeculado ósseo neoformado mostrou-se mais denso, e com atividade osteorreabsortiva periosteal menos conspícua em OTL. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na área de neorformação óssea entre CTL ($1,5 \pm 0,4\text{mm}^2$) e OTL ($1,9 \pm 0,3\text{cm}^2$) ($p = 0,0617$). Os parâmetros bioquímicos (Ca e ALKP) e hematológicos se encontravam dentro dos limites de normalidade, exceto por moderada monocitose observada em CTL. Os resultados da análise histológica mostraram-se biocompatível e quando comparado ao grupo controle não foi verificado diferenças significativas. Na avaliação radiográfica foi observada a presença de barreira mineralizada nos grupos: (CTR 76,65 e OTL 84,45), contudo, houve diferença estatística significativa ($p = 0,021$). Os resultados mostram que os otólitos apresentam boa compatibilidade em tecido subcutâneo e sugerem que podem desempenhar um papel adjuvante na dinâmica da regeneração óssea.

Palavras-chave: Otólitos. Neoformação óssea. Biominerais.

USE OF OTOLITHS *Cynoscion acoupa* IN BIOLOGICAL TESTS FOR BONE REPAIR AND BIOCOMPATIBILITY

ABSTRACT

Concrescence calcareous otoliths are present in the inner ear of fish. Assuming they are rich in minerals considered essential to the process of bone mineralization, and a protein matrix (otolina) has been suggested that otoliths could act as biominerals. Therefore, this study aimed to analyze the biocompatibility of the product, as well as the dynamics of regeneration of bone defects treated with sterile jelly prepared otoliths. To test the biocompatibility, polyethylene tubes containing prepared otoliths were implanted on the right side back of 24 Wistar rats, and the left were implanted tubes containing only hydrolyzed collagen (gelatin inert). The animals were killed after 3, 7 and 30 days, the tissue perimplant was removed, fixed in formalin and processed for paraffin embedding. Histological sections stained with HE were obtained and analyzed by light microscopy. Subsequently, artificial bone defects were made in the femur of 20 rats were divided into 02 groups: control group (CTL), whose bone defects did not receive any additional treatment, and experimental group (OTL), where the defects were filled with the prepared otoliths. The animals were killed 14 days after surgery, the femurs were removed and performed radiographic images of bone defects produced in groups CTR and OTL. We make use of ImageTool software (UTHSCSA ImageTool, version 3.0) for radiographic evaluations. After that, were fixed in formalin, decalcified in nitric acid 0.5% and processed histologically. Before euthanasia, blood samples were collected for assessments of serum calcium (Ca) and alkaline phosphatase (ALKP) as well as conventional hematological parameters (blood count). In the study of biocompatibility, we observed a similar pattern of inflammatory response in the connective tissue circumjacent both implants, of magnitude ranging between moderate and severe in three days and mild to absent in 30 days. There were no granulomatous formations acute or persistent leakages around the implants. Foci of calcification were detected in tissue perimplant tube with PGO. In the study of bone healing, the histological sections revealed that the newly formed trabecular bone was more dense, and activity periosteal bone resorption less conspicuous in OTL. No statistically significant differences were found in the area of bone between newly formed CTL ($1.5 \pm 0.4 \text{ mm}^2$) and OTL ($1.9 \pm 0.3 \text{ cm}^2$) ($p = 0.0617$). Biochemical parameters (Ca and ALKP) and hematology were within normal limits except for moderate monocytosis observed in CTL. The results of histological analysis showed to be biocompatible, however, when compared to the control group there were no significant differences. Radiographic evaluation was observed in the presence of a mineralized groups: (CTR 76.65 and 84.45 OTL), however, there is statistically significant difference ($p = 0.021$). The results show that the otoliths have good compatibility in the subcutaneous tissue and suggest to may play an adjunctive role in the dynamics of bone regeneration.

Keywords: Otoliths. Bone regeneration. Biominerals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Pescada Amarela.....	20
Figure 01 - Histological evaluation of the biocompatibility of the control (CI) and toliths (OI) implants groups. Moderate chronic inflammatory reaction (CI) observed surrounding the polyethylene tube (pt) in both CI (a) and OI (b) on the 3 rd day. Well-developed granulation tissue (gt) was seen in both groups (c and d), but only in OI there was signs of dystrophic calcification (arrow) (d). Fibroblastic reaction (fr) was verified surround the polyethylene tubes (pt) in CI (e) and OI (f), whereas calcified globules were observed in the latter (arrow) (f) (HE, 100x).....	32
Figura 02 - Imagens radiográficas do defeito ósseo produzido nos grupos CTR e OTL após 14 dias. Observar maior radiopacidade do defeito no grupo experimental (OTL).....	44
Figura 03 - Tela aberta do software Image Tool [®] durante procedimento de análise morfológica da área de neoformação óssea nos grupos estudados.....	45
Figura 04 - Área osteotomizada exibindo trabéculas ósseas irregulares delgadas e entrelaçadas (TN) e espaços medulares estreitados (EM) no grupo controle	46
Figura 05 - Área osteotomizada exibindo trabéculas ósseas irregulares delgadas e entrelaçadas (TN) e espaços medulares estreitados (EM) no grupo experimental	47
Figura 06 - Observar tendência a um maior estreitamento dos últimos em relação aos primeiros. O perióstio (P) exibe fibrose em ambos os grupos, mas a superfície óssea (SO) mostra mais irregularidade no grupo de controle, inclusive com áreas de expressiva reabsorção óssea (*), que no experimental (HE, 100x).....	47
Figura 07 - Observar tendência a um maior estreitamento dos últimos em relação aos primeiros. O perióstio (P) exibe fibrose em ambos os grupos, mas a superfície óssea (SO) mostra mais irregularidade no grupo de controle, inclusive com áreas de expressiva reabsorção óssea (*), que no experimental (HE, 100x).....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Análise morfométrica da área de neoformação óssea na região osteotomizada (μ^2) nos grupos experimental e controle.	48
Gráfico 02 - Dosagens séricas de cálcio nos grupos experimental e controle.....	48
Gráfico 03 - Dosagens séricas de fosfatase alcalina (Alk p) nos grupos experimental e controle..	49
Gráfico 04 - Densidade radiográfica otólitos e controle	50

LISTA DE TABELAS

Table 01 - Assessment of the intensity of the inflammatory infiltrate surround the open extremity of the polyethylene tubes in both CI (control implants) and OI (otoliths implants) groups.....	33
Tabela 01 - Distribuição dos valores hematológicos da série leucocitária nos animais dos grupos Controle e Experimental.	49
Tabela 02 - Distribuição dos valores hematológicos relativos da série eritrocítica nos animais dos grupos Controle e Experimental.....	50
Tabela 03 - Densidade radiográfica otólitos e controle.....	51

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO I	14
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Tecido Ósseo.....	14
1.2 Regeneração Óssea.....	16
1.3 Biominaerais e Regeneração Óssea.....	18
1.4 Pescada Amarela.....	19
1.5 Otólitos	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO II	27
SCIENTIFIC ARTICLE	27
HISTOLOGICAL EVALUATION OF BIOCOMPATIBILITY OF Cynoscion acoupa OTOLITHS IN RATS	27
ABSTRACT	28
REFERENCES	37
CAPÍTULO III	38
ARTIGO CIENTÍFICO.....	38
UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE Cynoscion acoupa EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE REPARO ÓSSEO.....	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Obtenção do Preparado de Otólitos:.....	43
2.2 Experimentação em Animais	43
2.3 Hemograma e Dosagem Sérica de Cálcio e Fosfatase Alcalina.....	43
2.4 Análise Radiográfica	44
2.5 Análise Morfológica.....	45
2.6 Análise Estatística.....	45
2.7 Resultados.....	46

3 DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO IV	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS - A inserção da Pesquisa na Temática Saúde e Ambiente e na Ótica Interdisciplinar:	59
APÊNDICE	61
Apêndice A - Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa	62

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é frequentemente acometido por defeitos provocados por traumatismo, doenças de origens e comportamentos variados, infecções e deformidades congênitas (LEONEL *et al.*, 2004). O reparo de tais defeitos ósseos continua representando um desafio, onde métodos tradicionais de tratamento lançam mão do enxerto ósseo autógeno, especialmente por sua propriedade osteogênica e facilidade de incorporação em relação aos enxertos homogêneos e xenogêneos. Ressalta-se, contudo, que a aquisição de enxerto ósseo autógeno agrega alguns riscos ao paciente, a exemplo de incisão cirúrgica adicional, aumento da morbidade pós-operatória, debilitação do local doador e disponibilidade de quantidade insatisfatória de material para enxerto (FINKEMEIER, 2002). Em vista destas dificuldades, uma grande variedade de materiais alternativos para preenchimento de defeitos ósseos, denominados biomateriais, tem sido desenvolvida (FIGUEIREDO, 2001; KALISH *et al.*, 2008).

Os biomateriais caracterizam-se por sua biocompatibilidade e atoxicidade, além de não apresentarem carcinogenicidade e exibirem resistência mecânica, elasticidade e estabilidade química e biológica (GARCIA JR, 2000). Biomateriais inorgânicos são, por sua vez, compostos alternativos ao uso de enxertos ósseos autógenos por serem produzidos com propriedades potencialmente semelhantes às do tecido receptor e, quando usados em defeitos ósseos longos, constituem elementos capazes de promover ou auxiliar a neoformação óssea, por mecanismos de osteoindução e/ou osteocondução (SERVICE, 2000).

Dentre os diversos biomateriais com provável atividade sobre a neoformação óssea, merece destaque o grupo dos biominerais. Estes representam tecidos duros que consistem basicamente de compostos inorgânicos e, entre suas funções, citam-se a manutenção da estrutura corporal, proteção e estocagem de minerais (MANN, 2002). Tais biominerais consistem de uma fase predominantemente mineral incorporada a uma matriz orgânica representada por uma rede complexa de glicoproteínas, proteoglicanas e proteínas colagênicas e não colagênicas (LOWENSTAM, WEINER, 1989); assim, a superfície das partículas dos biominerais atua como uma matriz sobre a qual a reparação óssea se desenvolve (ELLIS, SINN, 1993). Borelli *et al.* (2003) demonstraram que a presença de uma matriz orgânica acelera a neoformação óssea por facilitar a incorporação de minerais por difusão passiva.

Otólitos são concreções calcárias do ouvido interno dos peixes ósseos e constituem parte de um sistema que atua como sensor de profundidade e equilíbrio, assim

como detector de vibrações sonoras (BASTOS, 1990). Estudos vêm demonstrando que otólitos são ricos em carbonato de cálcio, elementos metálicos (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K, etc.) e não metálicos (Si, P, S, B, etc.) (CAMPANA, NEILSON, 1985), e em uma proteína colagênica de alto peso molecular denominada otolina (MURAYAMA *et al.*, 2002; BORELLI *et al.*, 2003; MURAYAMA *et al.*, 2004; TOHSE *et al.*, 2008).

Admite-se, pois, que otólitos poderiam representar um excelente exemplo de biomineral, uma vez que apresentam uma porção inorgânica rica em elementos essenciais ao processo de mineralização, bem como uma porção protéica (otolina), que poderia funcionar como matriz orgânica. Assim, dentro desta perspectiva, estudou-se o comportamento da regeneração do tecido, em defeitos ósseos artificialmente induzidos, preenchidos com um preparado gelatinoso estéril de otólitos de pescada amarela, com intuito de avaliar a influência desses biominerais no processo de neoformação óssea.

Para tanto, este trabalho foi dividido em três capítulos: No primeiro capítulo foi realizada uma revisão bibliográfica no intuito de apresentar o estado de discussão e conhecimento atual da arte a respeito do tema em estudo. No segundo capítulo, foi apresentado um estudo de biocompatibilidade dos otólitos em modelo roedor, a fim de averiguar se este biomineral poderia ser utilizado em sistemas orgânicos viáveis. No terceiro capítulo, foi relatado um estudo experimental preliminar sobre a influência dos otólitos no processo de neoformação óssea em modelo roedor.

CAPÍTULO I

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tecido Ósseo

Embora seja consenso geral que o osso é um órgão individual do sistema esquelético, o termo osso tem, no mínimo, três significados, segundo Parfitt *et al.* (1987). O primeiro é matriz óssea mineralizada excluindo o osteóide; este uso se adequa rigorosamente à definição de osso como tecido duro. O osteóide é a matriz óssea que vai ser mineralizada e, às vezes, é chamado de pré-osso. O segundo significado de “osso” é matriz óssea mineralizada ou não, isto é, inclui osso mineralizado e osteóide. O terceiro significado de “osso” é um tecido incluindo medula óssea e outros tecidos moles. Parfitt *et al.* (1987) referem-se à combinação de osso e tecido mole associados ou medula como “tecido ósseo”.

O osso é um material composto poroso constituído de duas faces, sendo estas primariamente compostas por colágeno e matriz mineral, que juntas são responsáveis por suas propriedades mecânicas (BURR, 2002). De maneira simplificada, pode-se dizer que as fibrilas de colágeno resistem às forças de tração, e a matriz mineral resiste à compressão (ALBERTS *et al.*, 1989).

A matriz óssea orgânica contribui com, aproximadamente, 30% do peso e tem como principal componente a molécula de colágeno tipo I (95%), da qual se origina a molécula de tropocolágeno. Por sua vez, este consiste de três cadeias polipeptídicas que se enrolam em hélice e estão unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio (DUARTE, 1977; MARCUS, *et al.*, 1996). As moléculas de tropocolágeno agregam-se, formando as fibrilas (suas secções transversais exibem várias moléculas de tropocolágeno unidas como se fosse a de um cabo de aço). As fibrilas apresentam propriedades elásticas e localizam-se nas direções dos esforços físicos, sendo importante que elas permaneçam ligadas entre si (DUARTE, 1977; MARCUS *et al.*, 1996). Martini (1998); Junqueira; Carneiro (2008) relatam que o osso tem como funções primárias: suporte, proteção, sistemas de alavanca, depósito de minerais e lipídeos e produção de células sanguíneas.

O esqueleto fornece suporte estrutural a todo o corpo humano, ossos individualizados ou em grupos dão estrutura e proteção aos tecidos moles e órgãos. O tórax

protege o coração e os pulmões, o crânio engloba o cérebro, as vértebras protegem o cordão espinhal e a pélvis embala delicadamente os órgãos dos sistemas reprodutivo e digestivo. Alguns ossos funcionam como alavancas que podem alterar a magnitude e a direção das forças geradas pelos músculos esqueléticos. O sistema de alavancas multiplica a força gerada durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos corporais. Os movimentos variam da delicadeza motora da flexão de um dedo a movimentos vigorosos nas alterações do corpo.

Sem o esqueleto para resistir, a contração das fibras musculares seria incapaz de, por si só, fazer-nos andar, sentar, correr ou desenvolver outras atividades. Sem algo para tracioná-los, os músculos simplesmente iriam ser curtos, redondos e não desempenhariam suas funções (MARTINI, 1998).

O tecido ósseo tem a função de estocar minerais e íons inorgânicos que contribuem para a osmolaridade necessária dos fluidos corporais. Esses íons e minerais participam dos vários processos fisiológicos como um todo, inclusive como cofatores enzimáticos. Os sais de cálcio dos ossos representam uma valiosa reserva mineral que mantém as concentrações normais dos íons cálcio e fosfato nos fluidos corporais. O esqueleto estoca energia ao armazenar lipídeos nas áreas da medula óssea amarela. As células vermelhas e brancas do sangue, assim como outros elementos sanguíneos, são produzidas na medula óssea vermelha que preenche a cavidade interna de alguns ossos;

As características ósseas de dureza, resistência e elasticidade são dadas pela associação dos cristais de hidroxiapatita que é o componente mineral mais importante do osso, (65% do seu peso), com as fibras colágenas. O osso é forte, minimamente flexível e muito resiste a fraturas. As fibrilas estabilizadas formam-se em planos chamados lamelas, sendo que as fibrilas de uma lamela, quando orientadas, formam um ângulo de, aproximadamente, 90° com a orientação de outras fibrilas da lamela consecutiva (DOBLARÉ; GARCIA; GÓMEZ, 2004; DUARTE, 1977).

De acordo com Junqueira; Carneiro (2008), as células ósseas podem ser classificadas em: Osteoblastos que produzem a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Osteócitos localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas, formam-se canalículos ligando-se para outras lacunas, tornando, assim, a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os

osteócitos. Estes têm papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea. Osteoclastos que participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células grandes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos.

As células ósseas são comumente renováveis, sendo o osso constantemente depositado pelos osteoblastos e continuamente absorvido nos locais em que os osteoclastos estão ativos. Os osteoblastos são encontrados nas superfícies externas dos ossos como também em suas cavidades. Verifica-se um pequeno grau de atividade contínua osteoblástica em todos os ossos vivos, cerca de 4% de todas as superfícies, de modo que ocorre formação constante de pelo menos certa quantidade de osso novo. O resultado entre as atividades das células é muito importante, porque se a atividade osteoclástica predomina, o osso torna-se muito forte e denso (MARTINI, 1998; GUYTON, 2002).

O tecido ósseo é muito elástico, apesar de sua resistência e de sua dureza, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações das forças a que está submetido normalmente. O comportamento mecânico tendo como resultado da aplicação de uma força é influenciado pelo fato de que o osso é um material visco-elástico. Contudo, quando uma força é aplicada, o osso tende a resistir “imóvel” ou deformar-se. Quando a força não ultrapassa o limite elástico do osso, toda a deformação elástica é recuperada no menor tempo possível logo após a retirada da carga ou força. Sabe-se que as forças e cargas superiores ao limite elástico ósseo em pouco tempo de recuperação podem levar a deformações plásticas permanentes ou fraturas (GUYTON, 2002).

Nas fraturas, ocorre hemorragia local pela lesão dos vasos sanguíneos do osso e do perióstio, assim como destruição da matriz e morte de células ósseas junto ao local fraturado. Para o reparo ósseo, é necessária a regeneração desse tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

1.2 Regeneração Óssea

Para que a regeneração óssea se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos. O perióstio e o endóstio próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteogênicas que constitui um colar em torno da fratura e penetra entre as extremidades ósseas rompidas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Segundo Flach et. al. (2008), a regeneração óssea é um dos processos de

reparo mais importantes do corpo porque o osso, assim como o fígado, é um dos poucos órgãos aptos a sofrer regeneração espontânea, em vez de apenas restaurar uma estrutura já existente. Os ossos longos regeneram de duas formas distintas: por formação de calo ósseo de origem tanto periostal quanto endostal e por regeneração haversiana direta. As mudanças associadas com a regeneração óssea podem ser artificialmente consideradas como uma série de estágios ou fases que ocorrem em sequência, mas que na, realidade, ocorrem até certo ponto.

Os osteoclastos formam pontas de lanças nas extremidades dos canais haversianos próximos ao sítio da fratura e estes tornam-se aumentados para preparar a formação de um sistema novo. Os osteoclastos em ponta-de-lança podem avançar a uma taxa diária de 50 a 80m em direção e através da superfície fraturada, com a síntese de canais haversianos grandes que atravessam de um fragmento a outro da fratura. Os osteoblastos seguem imediatamente para formar novos ósteons que ficam transversais ao sítio da fratura, substituindo os ósteons velhos privados de suprimento vascular local. Existindo um espaço entre os fragmentos de uma fratura ou caso não haja certa imobilização segura, esse tipo de regeneração não ocorre. Contudo, a ausência de calo reflete a falta de alguns estímulos que atraem a expressão de células osteogênicas na camada de câmbio do perióstio (FLACH et. al., 2008).

Com a volta gradual do osso às suas atividades, as trações e pressões normais a que está sujeito voltam a atuar e vão determinar a remodelação do calo ósseo. Assim é que pouco a pouco o tecido ósseo primário do calo vai sendo reabsorvido e substituído por tecido ósseo lamelar, até que a estrutura que o osso apresentava antes da fratura seja totalmente refeita. Segundo Junqueira; Carneiro (2008), apesar de sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido normalmente.

Diferentes modelos de reparação óssea têm sido amplamente estudados em alvéolos dentários, defeitos nos ossos longos e, sobretudo, na tábua craniana. Entretanto, modelos experimentais de regeneração óssea, em ossos não membranosos têm sido pouco relatados na literatura. Schenk (1977) apud Ribeiro *et al.*(1996) estudou a cicatrização de orifícios ósseos na cortical da tíbia de coelhos com perfuração de 0,1mm. Kattagen; Mittelmeier(1994) apud Ribeiro *et al.*(1996) fizeram perfuração de 6mm de diâmetro em côndilos femorais de coelhos. Verificaram que a cavidade foi preenchida, inicialmente, por coágulo sanguíneo que se organizou com tecido de granulação e fibrose. Após duas semanas, o início da regeneração óssea foi visto na periferia do orifício. Entretanto, o osso

neoformado ficou confinado à periferia e, com a evolução do processo, grande parte da cavidade permaneceu sem osso e preenchida por medula gordurosa.

Ainda nos dias atuais, o reparo de defeitos ósseos provocados por traumatismo, infecções, deformidades congênitas e outras doenças de origem e comportamentos variados constitui um desafio, em que métodos tradicionais de tratamento lançam mão do enxerto ósseo autógeno, especialmente por sua propriedade osteogênica e facilidade de incorporação em relação aos enxertos homogêneos e xenógenos. O enxerto autógeno agrega ao paciente situações, tais como: incisão cirúrgica adicional, aumento da morbidade pós-operatória, debilitação do local doador e disponibilidade de quantidade insatisfatória de material para enxerto (FINKEMEIER, 2002). Portanto, uma grande variedade de materiais alternativos aos enxertos para preenchimento de defeitos ósseos, denominados biomateriais, tem sido desenvolvida (FIGUEIREDO, 2001), caracterizando-se por sua biocompatibilidade e atoxicidade, além de não apresentarem carcinogenicidade e exibirem resistência mecânica, elasticidade e estabilidade química e biológica (GARCIA JR, 2000).

Um relevante fator a ser considerado na pesquisa de novos biomateriais refere-se à grande biodiversidade brasileira que abriga, atualmente, entre 15 a 20% das espécies vegetais, animais e microorganismos do mundo. Apesar do crescente interesse internacional por essa biodiversidade, sabe-se que ela por si só não é garantia de crescimento econômico, tampouco de desenvolvimento sustentável se pesquisas que comprovam a eficiência científica do produto não forem desenvolvidas (RECH, 2008). Espera-se, portanto, que o Brasil, além de importante exportador de matéria-prima, invista em pesquisas e converta-se no protagonista de uma nova economia mundial, baseada no uso sustentado da biodiversidade e dos seus recursos derivados, agregando valor para os diferentes setores produtivos (RECH, 2008).

Biomateriais inorgânicos são compostos produzidos com propriedades potencialmente semelhantes às do tecido receptor e, quando usados em defeitos ósseos longos, constituem elementos capazes de promover ou auxiliar a neoformação óssea, por mecanismos de osteoindução e/ou osteocondução (SERVICE, 2000). Dentre os diversos biomateriais com provável atividade sobre a neoformação óssea, merece destaque o grupo dos biominerais (FINKMEIR, 2002).

1.3 Biominerais e Regeneração Óssea

Os biominerais consistem de uma fase predominantemente mineral incorporada

a uma matriz orgânica representada por uma rede complexa de glicoproteínas proteoglicanas e proteínas colagênicas e não colagênicas (LOWENSTAM; WEINER, 1989). Assim, a superfície das partículas dos biominerais atua como uma matriz sobre a qual a reparação óssea desenvolve-se (ELLIS, SINN, 1993). Borelli *et al.* (2003) demonstraram que a presença dessa matriz orgânica acelera a neoformação óssea por facilitar a incorporação de minerais por difusão passiva. Esses representam tecidos duros que consistem basicamente de compostos inorgânicos e, entre suas funções, citam-se a manutenção da estrutura corporal, proteção e estocagem de minerais (MANN, 2002). Dentre os biominerais utilizados para reparo ósseo, encontram-se a hidroxiapatita, alguns metais como o Titânio, Zircônio e o Nióbio (KARLINSEY *et al.*, 2006).

Murayama *et al.*, (2002) acreditam que os otólitos, por apresentarem uma porção inorgânica rica em elementos essenciais ao processo de mineralização, bem como uma porção protéica (otolina), funcionariam como matriz orgânica, podendo representar um excelente exemplo de biomineral.

Valido (2010), em estudo recente, concluiu que os otólitos da pescada amarela são biocompatíveis e induziram a regeneração da pulpa dentária em cães. Portanto, os otólitos podem ser uma alternativa à classe de biomimerais capazes de promover a dinâmica da regeneração de defeitos ósseos.

1.4 Pescada Amarela

A pescada amarela, *Cynoscion acoupa*, é uma espécie demersal pertencente à família Sciaenidae que ocorre em águas rasas tropicais e subtropicais da costa atlântica da América do Sul, apresentando tolerância para as águas salobras (MATOS; LUCENA, 2006).

É um importante recurso pesqueiro mundial com cerca de 70 gêneros e 270 espécies, amplamente distribuído nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, ocorrendo, principalmente, em águas marinhas e estuarinas (MATOS; LUCENA, 2006). No Brasil existem cerca de 21 espécies de pescada, sendo que a Amarela, a maior delas, chega a medir de 80 cm a 150 cm de comprimento e pode pesar até 20 quilos, frequenta águas rasas próximas à costa, enseadas e também poços fundos no interior de baías, sendo encontradas em todo o litoral brasileiro (SZPILMAN, 2000). A espécie tem grande valor comercial, tanto pela qualidade de sua carne quanto também pela bexiga natatória, denominada “grude”, utilizada para a elaboração de emulsificantes e clarificantes (CERVIGÓN, 1993; WOLFF *et al.*, 2000).

Em estuários da costa Norte do Brasil, espécies menores são abundantes (CASTRO, 1997; BARLETTA-BERGAN *et al.*, 2002) e na zona litorânea do estado de Sergipe, é comum encontrar espécies que variam de 51cm a 125 cm de comprimento total (MATOS; LUCENA, 2006).

O formato do corpo da pescada amarela é roliço e mais alongado que o de seus congêneres. A cabeça é relativamente grande e ocupa cerca de 1/4 do comprimento do corpo. Possui boca terminal ampla e suas maxilas estão providas de pequenos dentes acirculares, que não são muito desenvolvidos. A nadadeira caudal é romboidal. As nadadeiras dorsais, com raios duros e moles, são bem altas e desenvolvidas. A coloração geral é amarelada, um tanto dourada, principalmente no dorso e na extremidade das nadadeiras, sobre fundo prateado nos flancos e no ventre. A região dorsal também pode ser mais escura, em tons de cinza; no ouvido interno desses peixes, encontram-se os otólitos (PESCA.TUR.BR, 2010).

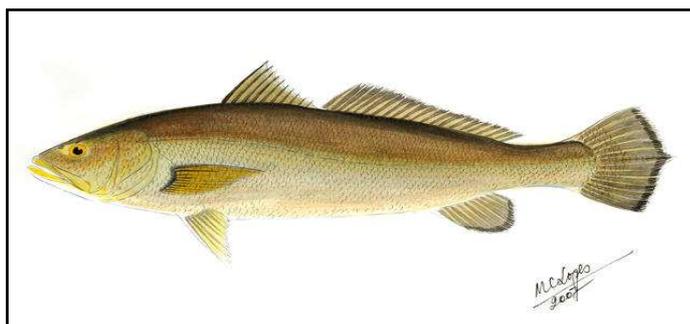


Figura 01 – Pescada Amarela

Fonte: <http://www.google.com.br/>

1.5 Otólitos

Otólitos ou “ear-stone” são concreções calcárias sob a forma mineral de aragonita, embutidas em uma matriz protéica, encontradas no ouvido interno de peixes ósseos (situado na cabeça e atrás dos olhos), na base dos canais semicirculares, em bolsas denominadas de utrículos, sacculus e lagena, cada uma com um par de estruturas mineralizadas: lapillus, sagitta e asteriscus (CORRÊA; VIANNA, 1992). A forma e o tamanho dos otólitos variam muito de acordo com as características das espécies (PANFILI *et al.*, 2002). Estudos vêm demonstrando que os mesmos são ricos em carbonato de cálcio, elementos metálicos (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K) e não metálicos (Si, P, S, B) (NEILSON, 1985) e em uma proteína colagênica de alto peso molecular, denominada otolina (BORELLI *et al.*, 2003).

Os otólitos são formados extracelularmente pela cristalização do carbonato de cálcio - CaCo₃ (essencialmente na forma de Aragonita - mas também de calcita ou vaterita) em uma matriz protéica de fibras colagênicas (proteína do tipo queratina, designada por otolina) (FALINI *et al.*, 2005).

O otólito cresce pela adição de camadas concêntricas de carbonato de cálcio e de proteína, resultando em uma estrutura de algum modo comparável a uma cebola (PANFILI *et al.*, 2002). A matriz de otólitos é formada por duas proteínas, uma solúvel e outra insolúvel em EDTA, denominadas proteína de matriz de otólitos-1 (OMP-1) e otolina-1, respectivamente (MURAYAMA *et al.*, 2005).

A otolina-1 é uma proteína colagenosa pertencente à família do colágeno VIII e X e é produzida por grupos restritos de células cilíndricas localizadas na zona marginal do epitélio sensorial. Cerca da metade das macromoléculas da matriz dos otólitos é insolúvel em água e presume-se que estejam envolvidas no processo de mineralização dessa estrutura, utilizando carbonato de cálcio (FALINI *et al.*, 2005).

O colágeno tipo VIII é encontrado frouxamente disperso em membranas basais em diferentes tecidos, enquanto o colágeno X é observado apenas na matriz protéica da zona hipertrófica da cartilagem hialina, presente em placas epifisárias de crescimento. Moléculas de colágeno tipo VIII e X parecem estar associadas ao processo de mineralização de matrizes não calcificadas (SUTMULLER *et al.*, 1997).

Segundo Borelli *et al.* (2003), a presença de matriz orgânica acelera a calcificação de constituintes protéicos por facilitar a incorporação de minerais por difusão passiva, de modo que a composição química dos constituintes orgânicos protéicos dos otólitos possa representar o elemento-chave para a dinâmica da calcificação dessas estruturas anatômicas e fisiológicas.

Os otólitos são responsáveis pela manutenção de equilíbrio dos peixes, sentido de orientação e pela detecção de vibrações sonoras (BASTOS, 1990; FALINI *et al.*, 2005). De acordo com Vaz-dos-Santos *et al.* (2007), os otólitos são utilizados desde o final do século XIX para a determinação clássica das idades dos peixes, determinação de locais de nascimento e de padrões migratórios, detecção de eventos importantes no ciclo de vida dos peixes, a exemplo da alimentação exógena, metamorfose, delimitação de unidades populacionais e reprodução, sendo estas algumas das muitas aplicações possíveis. São,

portanto, elementos úteis, senão essenciais para inter-relação de estudos etnobiológicos, paleontológicos, ecológicos e biológicos pesqueiros.

No Brasil, os otólitos são ainda pouco utilizados e os trabalhos permanecem restritos a descrições morfológicas isoladas para a caracterização de populações de espécies ícticas e para auxiliarem as estimativas de idade e crescimento. É comum ouvir os pescadores referirem-se aos otólitos como “as pedras do juízo” do peixe. Popularmente, são utilizados como amuletos, ornamentos (colares, brincos, etc.) e pelas suas propriedades afrodisíacas (CORRÊA; VIANNA1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. *et al.* (1989). **Differentiated cells and the maintenance of tissues**. In: Molecular Biology of the Cell. ed. Garland Publishing, Inc. New York & London. p. 989-990.
- BARLETTA-BERGAN, A.; BARLETTA, M.; SAINT-PAUL, U.. 2002 **Structure and Seasonal Dynamics of arval Fish in the Caete´ River Estuary in North Brazil**. Estuarine, Coastal and Shelf Science, Londres, 54: 193–206.
- BASTOS, C. C. G.. **Morfologia de Otólitos de algumas espécies de perciformes (Teleostei) da costa sudeste-sul do Brasil**. São Paulo, 1990.
- BORELLI, G., *et al.*. **Composition of biomineral organic matrices with special emphasis on turbot (Psetta maxima) otolith and endolymph**. Calcif Tissue Int. v.72, n. 6, p. 717-25, 2003.
- BURR, D. B.. **The contribution of the organic matrix to bone’s material properties**. Bone, v. 31, n. 1, p. 8-11. jul., 2002.
- CAMPANA, S. E.; NEILSON, J. D.. **Microstructure of fish otholiths, Can, J, Fish, Aquat, Sci** ,42(5):1014-1032, 1985.
- CASTRO, A. C. L.. **Características ecológicas da ictiofauna da Ilha de São Luís – MA**. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, São Luiz, 10: 1-18, 1997.
- CERVIGÓN, F.. **Los peces marinhos de Venezuela**. vol. II. 2. ed. Venezuela: ExLibris, 1993.
- CORRÊA, Marco Fábio Maia; VIANA, Márcia Scala. **Catalogo de otólitos de sciaenidade (osteichthyes – perciformes) do litoral do estado do Paraná, Brasil**. Centro de Estudos do Mar – UFPR, 1992
- DAY S. M.; OSTRUM R. F.; CHAO E. Y. S.; RUBIN C. T.; ARO H. T., EINHORN T. A.: **“Bone Injury, Regeneration, and Repair”** In Buckwalter J.A., Einhorn T.A., Simon S.R.: **Orthopaedic basic science**. Chicago, AAOS, p.p. 371-399, 2000.
- DOBLARÉ, M.; GARCIA, J. M.; GÓMEZ, M. J.. **Modeling bone tissue fracture and healing: a review**. Engineering fracture mechanics. New York, v. 71, n. 13/14, p. 1809 - 1840, Sept, 2004.
- DUARTE, L. R.. **Estimulação ultra sônica do calo ósseo**. Tese (Livre Docência) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 1977.
- ELLIS, III E.; SINN, D. P., **Use of homologous bone in maxillofacial surgery, I, Oral Maxilloface Surg**; 51 (11): 1181-93, 1993.
- FALINI, G; FERMANI, S; VANZO, S; MILETIC, M; ZAFFINO, G. **Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules**. Eur. J. Inorg. Chem., 162-167, 2005.
- FIGUEIREDO, A. S.. **Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita porosa de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno, em coelhos** [Tese-Doutorado], Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, 2001.

FINKMEIR, C. G.. **Bone- grafting and bone-graft substitutes**, J Bone Joint Surg; 84 (3): 454-65, 2002.

FLACH, Denise M.; GORGOZINHO, Kátia B.; PRAZERES, Mônica N.; SOUZA JUNIOR, Paulo de; SOUZA, Valéria G. de.. **Regeneração óssea em cães e gatos**. Niterói: Universidade Federal Fluminense Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, 2008.

GARCIA JUNIOR, I. R.. **Avaliação experimental de três diferentes tipos de implantes: polímero de mamona, polietileno poroso de alta densidade e matriz óssea bovina no preenchimento de defeitos ósseos maxilares**: estudo histológico e histométrico em macacos [Tese-Doutorado] - Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2000.

GRANT, C. C; WALL C. R.; WILSON, C.; TAUUA, N. **Risk factors for iron deficiency in a hospitalized urban New Zealand population**. J Paediatr Child Health; 39(2): 100-6, mar. 2003.

GUYTON, Hall. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, p. 973, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. **Tecido ósseo**. In: **Histologia Básica**. 11. ed., p. 111 - 128. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KALISH, B. P.; SCHUSTER G. S.; PEACOCK, M. E.; CUENIN M. F.; SWIEC, G. D.; POTTER, B. J.; BUXTON, T. B.; MCPHERSON, J. C. R. D.. **Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (*Rattus norvegicus*) calvarium**. J Oral Implantol; 34(2):83-9, 2008.

KARLINSEY, Robert L.; MACKEY, Allen C.; FREDERICK, Katherine E.. **Structured niobium oxide**: morphology, bioactivity, and oxide-metal adhesion properties. Disponível em: <http://www.indiananotech.com/images/Karlinsey_Book_Chapter_2009.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2010.

LEONEL, F. C. E.; PORCIÚNCULA, F. H.; SOBRINHO, A. J.; RAMALHO, O. T.; IMANGILLI, D. P.; RAPOPORT, A.. **The action of the castor bean polymer during the bone neoformation**.. 2004.

LINDHEN, J. *et al.*. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LOWENSTAM H. A.; WEINER, S.. **Minerals and macromolecules** - On biomineralization, Oxford University Press, New York; 1989.

MANN, S. **The study of biominerals by high resolution transmission electron microscopy**. Scan Electron Microsc. v. 2, p. 393-413, 2002.

MARCUS, R. *et al.*. **Osteoporosis**. Londres: Academic Press, 1996.

MARTINI, F. H.. **Fundamental or anatomy and physiology**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.

MATOS, I. P.; LUCENA, F.. **Descrição da pesca da pescada-amarela, *Cynoscion acoupa*, da costa do Pará**. Arq. Ciên. Mar, Fortaleza, v. 39, p. 66-73, 2006.

MURAYAMA, E.; TAKAGI, Y.; NAGASAWA, H.. **Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout**. *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts Histochem; 121(2): 155-166, 2004.

MURAYAMA, E.; TAKAGI, Y.; OHIRA, T.; DAVIS, J. G.; GREENE, M. I.; NAGASAWA, H. **Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1.** Eur J Biochem, jan.; 269(2):688-96, 2002.

MURAYAMA, E; HERBOMELB, P; KAWAKAMIC, A; TAKEDAC, H; NAGASAWAA, H. **Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae.** Mechanisms of Development , v. 122, p. 791-803, 2005.

PANFILI, J.; H. de Pontual, H. Troadec & P.J.Wright, Manual of fish sclerochronology. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, 464 p.SZPILMAN, M. **Peixes Marinhos do Brasil: guia prático de identificação.** Rio de Janeiro: Mauad, 2002, 288p.

PARFITT, A.M *et al.*. **Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units.** Journal of Bone and Mineral Research, v. 2, n. 6, p. 595-610, 1987.

PESCA.TUR.BR. o seu portal de pesca. **Pescada amarela** (Cynoscion acoupa). Disponível em:<<http://www.pesca.tur.br/peixes/agua-salgada/pescada-amarela/>>. Acesso em 30 mar. 2010.

RECH, E.. **A biotecnologia, a sustentabilidade e a biodiversidade brasileira.** Disponível em: www.cib.org.br/pdf/biotecnologia_sustentabilidade_biodiversidade20.pdf. Acesso em 14 mar. 2008.

RIBEIRO, Ricardo Fonseca; AMSTALDEN, Eliane M. Ingrid, IZATTO, Isabel Cristina. **Modelo experimental de regeneração óssea espontânea.** Revista Brasileira de Ortopedia. n. 11, nov. 1996 Disponível em: <<http://www.rbo.org.br/materia.asp?ididioma=1&mt=1192>>. Acesso em: 30 mar. 2010.

SZPILMAN, M.. **Peixes marinhos do Brasil: guia prático de identificação.** Rio de Janeiro. 2000.

SERVICE, R. F. **Tissue engineers build new bone.** Science, v. 289, p.1498-500, 2000.

STEIN, G. S.; LIAN, J. B. **Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype.** Endocrin, Rev, v. 14, p. 424-42, 1993.

SUTMULLER, M.; BRUIJN, J.A, DE HEER, E.. **Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology.** Histol. Histopathol. v. 12, p. 557-66, 1997.

TOHSE, H.; TAKAGI, Y; NAGASAWA, H.. **Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths.** FEBS J. : mai.; 275(10):2512-23, 2008.

VALIDO, Daisy Pereira. **Estudo comparativo da utilização de otólitos de Cynoscion Acoupa após exposição pulpar em dentes de cães: um estudo experimental.** Dissertação de mestrado/ Programa de Pós-Graduação em Saúde Ambiente/ UNIT. Aracaju, 2010.

VAZ-DOS-SANTOS; A. M; SANTOS-CRUZ, N. N.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI CLDB. **Caracterização dos otólitos sagitta do peixe-lagarto Bemprops heterurus Miranda-Ribeiro, 1903 (Teleostei: Percophidae) da região Sudeste-Sul do Brasil** Bioikos, 2007.

VIEIRA, J. G. H. **Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas.** J Bras Patol Med Lab. v. 43, n. 2, p. 75-82, abr., 2007

WISHART, J. M.; NEED, A. G.; HOROWITZ, M. *et al.* **Effect of age on bone density and bone turnover in men.** Clin Endocrinol (Oxf); 42:141-6, 1999.

WOLFF, M.; KOCH, V.; ISAAC, V.. **A Trophic flow model of the Caeté mangrove estuary (north Brazil) with considerations for the sustainable use of its resources.** Estuarine, costal and shelf science. London: 50: 789-803, 2000.

CAPÍTULO II
SCIENTIFIC ARTICLE
HISTOLOGICAL EVALUATION OF BIOCOMPATIBILITY OF
***Cynoscion acoupa* OTOLITHS IN RATS**

Dênison Pereira da Silva¹, Sonia Oliveira Lima², Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior^{2, 3}, Lauro Xavier Filho^{2,3}

¹ Student of Master in Health and Environment/UNIT, Aracaju/SE;

² PhD Graduate Program in Health and Environment, Tiradentes University, Aracaju/SE;

³ Laboratory of Morphology and Structural Biology, Institute for Technology and Research, Aracaju/SE.

ABSTRACT

Otoliths are calcarian structures found in the inner ear of bony fishes, which work as balance organs. They are composed of calcium carbonate and a wide range of metallic and non-metallic elements, many of them involved in bone healing, associated to high molecular weight collagenous proteins. Due to its chemical composition it is possible to suppose that this material might work as a biomineral. Therefore, the purpose of this study was to assess the biocompatibility of the natural product in rodent model. Thus, 2 g powder of otolith of *Cynoscion acoupa* were added 0,5 g of hydrolyzed collagen (gelatin), and diluted in distilled water. The final preparation was sterilized in rays 60 gama/cobalt and inserted into Polyethylene tubes. Subsequently, 24 *Wistar* rats were anesthetized and subcutaneous pockets were carried out in the back of each animal. In the right side the tube containing otoliths were implanted, whereas gelatin-filled tubes were placed in the left side. The animals were euthanized 3, 7 and 30 days after the surgical procedures. The perimplant tissue was removed, formalin-fixed and paraffin-embedded, so that histological slides could be obtained and analyzed in light microscope. The inflammatory response was similar around both tubes. In three days, the infiltrate was neutrophils-rich, and the severity of the reaction ranged from moderate to severe. In 7 days, the infiltrate was predominantly lymphocytic, associated to the development of a delicate network of capillary blood vessels. In 30 days, the infiltrate was practically absent, and the tubes were surrounded by fibrous connective tissue. Granulomatous reaction or long-term acute infiltrate were not seen in this assay. Besides, foci of dystrophic calcification were observed only around the tubes filled with otoliths. It was concluded that the otoliths preparation was biocompatible in subcutaneous connective tissue of rats.

Key-Words: Otoliths, biocompatibility, rodent model

INTRODUCTION

Recently, many studies have been performed in attempt to improve bone regeneration by using acellular or cellular implantable materials (FINKMEYER, 2002). Biominerals are an alternative class of biomaterials able to induce or improve bone formation in substitution to the autogenic grafts when applied into large bone defects (SERVICE, 2000; BORELLI *et al.*, 2003). They consist of an inorganic phase (or phases) (usually simple salts or oxides) and a range of biomolecules that are often proteins, but may be carbohydrates, lipids or low-molecular-weight (<1 kDa) molecules such as polyamines. These biominerals are widely formed by bacteria, single-celled protists, plants, invertebrates and vertebrates including humankind (PERRY *et al.*, 2009).

Otoliths are crystalline structures, comprised primarily of calcium carbonate, located in the inner ear of bony fishes, which function as balance organs (CAMPANA, THORROLD, 2001). Studies have indicated that otoliths are rich in calcium carbonate, metallic elements (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K, etc) and non-metallic compounds (Si, P, S, B, etc.) (CAMPANA, NELSON, 1984), as well as in a high molecular weight collagenous protein called otolin (MURAYAMA *et al.*, 2002; MURAYAMA *et al.*, 2004; TOHSE *et al.*, 2008). Therefore, despite otolith applications strayed so far across taxonomic and methodological boundaries, due to its chemical composition it is possible to suppose that this material might work as a biomineral. However, both organic and inorganic biomaterials are characterized by biocompatibility and atoxicity, in addition to mechanical resistance, elasticity, and chemical and biological stability. Therefore, new materials demand research to evaluate their properties and commercial viability (HAN *et al.*, 2007; MORETTI NETO *et al.*, 2008).

Biocompatibility evaluations can be performed *in vitro* by cytotoxicity or genotoxicity tests, or *in vivo* studies using animals. Besides, subcutaneous implants in rats are regarded as one of the first screening *in vivo* evaluations, although afterwards more complex implants in larger animals simulating the real conditions of the implant material as grafts or prostheses must be used (MAIZATO *et al.*, 2008).

Thus, the goal of this study was to assess the biocompatibility of otoliths of *Cynoscion acoupa* by *in vivo* assays performed in Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

The material in this study was prepared with 2 g powder of otolith of *Cynoscion acoupa* with particle size 60 mesh and addition 0,5 g of hydrolyzed collagen, diluted in distilled water. The final product was packaged in dishes Petri and sterilized in rays 60 gama/cobalt.

In vivo assay was performed with 24 male Wistar rats (250 ± 50 g), supplied with food and water ad libitum in a temperature and humidity-controlled environment. The animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine (100mg/kg - 5mg/kg) and had the dorsal region submitted to trichotomy. Polyethylene tubes with 1.5-mm inner diameter, 2.0-mm outer diameter and 10.0 mm long were sterilized in autoclave prior to use. The otoliths preparation was placed into the polyethylene tubes and implanted into the subcutaneous tissue of the rats. Gelatin-filled tubes were used as control. The implants were placed subcutaneously into pockets created by a blunt dissection through 10 mm incision of the skin. Two pockets were created in the back of each animal, in the right side (otoliths implants – OI) and left side (control implants – CI). The samples were stitched to the dorsal muscle and the incision sutured by a monofilament wire (Mononylon5.0 Ethicon, Johnson and Johnson, Brazil). After surgery, the rats received intramuscular antibiotic cefazolin sodium (ABL, Brazil) 4 mg/kg and were kept under observation until recovered from the anesthesia. Eight rats were assigned to each time interval (3, 7 and 30 days), sizing up 24 animals. At the end of the experimental periods, the animals were euthanized in CO₂ chamber. The skin overlaying the implants was shaved and tubes with surrounding tissue were removed from the rats, immersed in formalin solution and fixed for 24 hours. The specimens were processed for paraffin embedding, serially sectioned into 5- μ m cuts and stained with hematoxylin and eosin.

The conditions of the tissue surrounding the implants, the occurrence and location of fibrous tissue, the types of inflammatory cells present, calcification and the vascular changes were assessed and graded between 0 (zero) and 4, as follows as follows:

- 0 (lack): absence of changes in the tissue examined;
- 1 (mild): changes presented in 1–10% of the tissue examined;
- 2 (moderate): changes presented in 11–50% of the tissue examined;
- 3 (severe): changes presented in more THAN50% of the tissue examined;
- Statistical analysis was performed by Kruskall-Wallis test and Dunn post-hoc test to determine significant differences among the groups. Significance level was set at 5%.

In accordance to the institution's guidelines outlined in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", it is hereby assured that all animals received humane care during all the steps of the experimentation. Furthermore, the study protocols were approved by our National Research Council prior to the beginning of the experiments (register 171205).

RESULTS

After surgery the cicatrization process showed no interurrences, and no rat presented overinduced inflammatory processes or apparent contamination.

Regarding the analysis of CI, on the 3rd day, a moderate to severe infiltrate of chronic cells and some few neutrophils was observed, but there were no giant cells or foci of necrosis (Figure 01a). The intensity of the inflammatory infiltration was milder on the 7th day, and blood vessels formation and fibroblastic proliferation were quite apparent, forming a mature granulation tissue (Figure 01c). On the 30th day, it was possible to observe a more organized connective tissue with predominance of collagen fibers, fibroblasts and an uncompletely formed capsule surrounding the implants (Figure 01e).

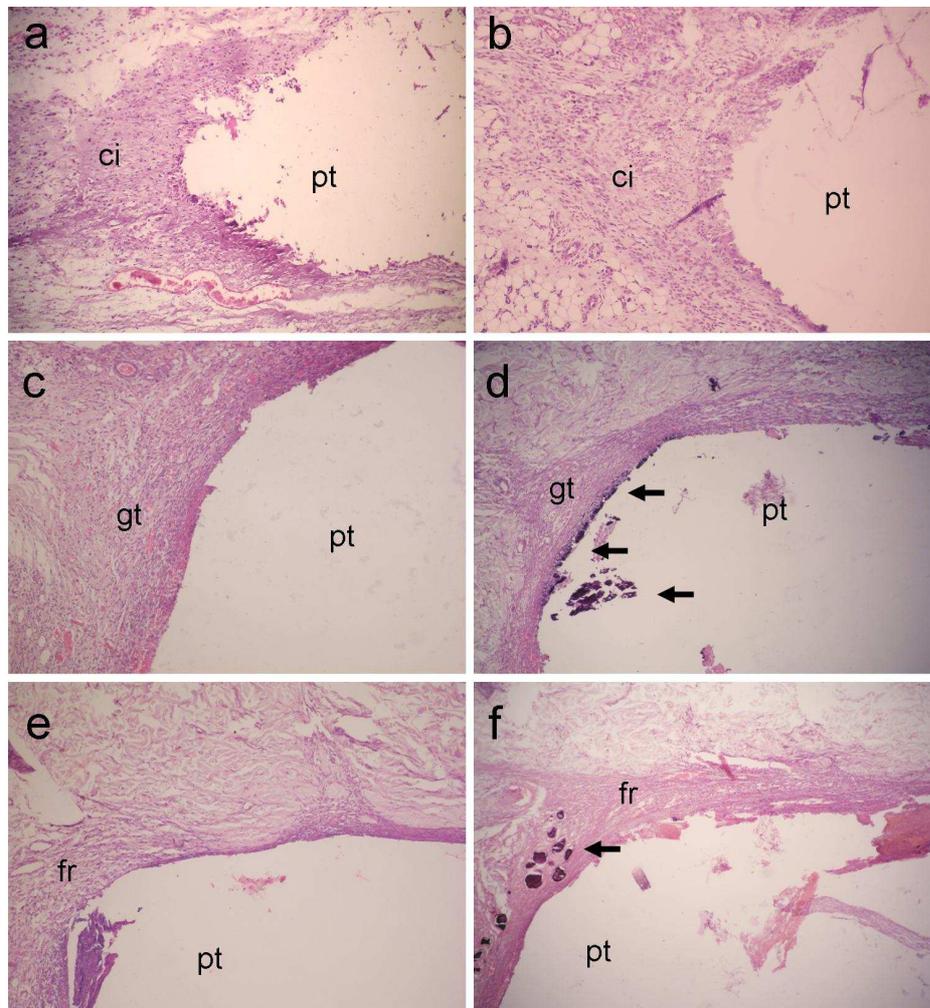


Figure 01 - Histological evaluation of the biocompatibility of the control (CI) and toliths (OI) implants groups. Moderate chronic inflammatory reaction (CI) observed surrounding the polyethylene tube (pt) in both CI (a) and OI (b) on the 3rd day. Well-developed granulation tissue (gt) was seen in both groups (c and d), but only in OI there was signs of dystrophic calcification (arrow) (d). Fibroblastic reaction (fr) was verified surround the polyethylene tubes (pt) in CI (e) and OI (f), whereas calcified globules were observed in the latter (arrow) (f) (HE, 100x).

In relation to OI, moderate chronic leukocytes infiltrate without necrosis or granulomatous reaction was observed on the 3rd day. The inflammatory reaction was characterized by presence of Lymphocytes, macrophages, and some scanty neutrophils. No granulomatous reaction was found. In addition, fibroblasts and few delicate collagen fibers were also seen (Figure 01b). On the 7th day, the severity of the inflammatory reaction was attenuated, and a well-developed granulation tissue was noticed (Figure 01d). On the 30th day, the connective tissue surrounding the implants was composed of new wavy fibroblasts and collagen fibers forming a thin capsule. Foci of dystrophic calcification were also seen (Figure 01f).

The Table 01 presents the results of the semi quantitative analysis of the intensity of the inflammatory infiltrate evaluated in both groups. No statistical difference between the groups was observed during the experimental periods ($p > 0.05$).

Table 01 - Assessment of the intensity of the inflammatory infiltrate surround the open extremity of the polyethylene tubes in both CI (control implants) and OI (otoliths implants) groups.

Experimental Periods	Implant Materials	Animals							
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Day 03	Control implants (CI)	3	2	3	2	2	2	2	2
	Otoliths Implants (OI)	3	3	2	2	3	2	2	2
Day 07	Control implants (CI)	1	1	1	1	2	2	1	2
	Otoliths Implants (OI)	2	2	1	1	2	1	2	1
Day 30	Control implants (CI)	0	1	0	1	1	1	1	0
	Otoliths Implants (OI)	1	2	1	1	1	0	1	0

DISCUSSION

Every material for biological use is supposed to be biocompatible (HAN *et al.*, 2007; MORETTI NETO *et al.*, 2008). In this study, the biocompatibility of otoliths preparation materials was assessed by examining their inflammatory reactions in 3, 7 and 30 days after subcutaneous implantation in the dorsal area of rats. This type of subcutaneous implant is widely used and easily reproduced (HAN *et al.*, 2007; MORETTI NETO *et al.*, 2008; MAIZATO *et al.*, 2008).

One of the most relevant factors in the analysis of a material's biocompatibility is its ready acceptance by the host tissues, eliciting an inflammatory response that should resemble that of the normal healing process. In this regard, *in vivo* implants are preferable, for providing more realistic information than *in vitro* systems about the host's responses at the interface between the implanted material and the surrounding biological environment (MRUE *et al.*, 2004).

The results showed that independently from the presence or not of the otoliths preparation within the polyethylene tubes, the inflammatory response predominantly chronic and decreasing. The attenuation of the intensity of the inflammatory infiltrate along the time, as well as the absence, in all the samples, of substantial infiltrated/neutrophilic exudate, necrosis, and bacteria reinforces the satisfactory evolution of the healing process (GOISSIS, PARREIRA, 2003). This fact is further reinforced by the absence of clinical signs of overinduced inflammation, such as abscess, edema or fistulation, as suggested by MAIZATO *et al.* (2008). The lack of granulomatous inflammation, as indicated by the absence of giant cells and epithelioid macrophages, is suggestive that no foreign body reaction developed as a response of the implantation of the biomaterial (HAN *et al.*, 2007; MAIZATO *et al.*, 2008). In addition, the pattern of the inflammatory evolution was similar in both groups, showing a gradual decrease in the intensity along the time. This fact attests the atoxicity and biocompatibility of the otoliths preparation.

As regards the allergenicity of this product, it should be emphasized that this biomaterial contains no toxic product, which is conventionally used in the rubber industry, nor any other adjuvants or preservatives (CAMPANA, NELSON, 1984; MURAYAMA *et al.*, 2002; BORELLI *et al.*, 2003; TOHSE *et al.*, 2008). The lack of allergenic properties was confirmed not only by the absence of any immediate or long-term clinical response (Type I and type IV hypersensitivity, respectively), but also by the lack of eosinophils infiltrate and granulomatous reaction in the paraffin-embedded tissue samples.

Dystrophic calcification represents the deposition of calcium salts in areas of degenerated or necrotic tissue, so that the absorption of the minerals is facilitated and stimulated by their high-affinity for fatty acids derived from the external membrane of injured cells (RUSSEL *et al.*, 1986). The lack of calcification in the control group, in addition to a decreasing chronic inflammatory infiltrate, is suggestive that the injury promoted by the surgical process of the tubes implantation was well supported by the host tissues. Nevertheless, the presence of calcification foci in some animals treated with otoliths preparation should not be misinterpreted as a result of tissue damage associated to the biomineral implantation. In fact, it is probably related to the high content of minerals in the preparation, as described in previous studies (CAMPANA, NELSON, 1984; CAMPANA, THORROLD, 2001). The gradual resorption of the hydrolyzed collagen matrices which composed the otoliths preparation might have led to a slow but continuous release of a wide sort of minerals involved in the dynamics of the calcification process, thus facilitating their deposition in the tissue. Despite dystrophic calcification is usually considered a sign of tissue damage, in this case it might be regarded as a good property, since this biomaterial is supposed to work as a calcification inducer biomineral. However, since this study focused in the analysis of biocompatibility of the otoliths preparation, further investigations will be required in attempt to assess its real role in the bone regeneration process.

The results indicated that the preparation of *Cynoscion acoupa*'s otoliths does not induce deleterious biological response after implantation in dermal tissues of rats. This experimental model proved to be suitable for *in vivo* evaluation of biocompatibility. The following step will be the quantitative analysis of the calcification by atomic emission spectrometry in order to assess the total calcium incorporated in the connective tissue surround the implanted materials.

CONCLUSION

The results of the histological analyses of subcutaneous implantation in Wistar rats of the otoliths preparation was considered biocompatible, as long as it has not induced, in the conditions described, significant differences in tissue reaction as compared to the control groups.

REFERENCES

- BORELLI, G.; MAYER-GOSTAN, N.; MERLE, P. L.; DE PONTUAL, H.; BOEUF, G.; ALLEMAND, D.; PAYAN, P.. **Composition of biomineral organic matrices with special emphasis on turbot (*Psetta maxima*) otolith and endolymph**. *Calcif Tissue Int.* 72(6):717-25, 2003.
- CAMPANA, S. E., NEILSON, J. D.. **Microstructure of fish otoliths**. *Can J Fish Aquat Sci.* 42(5): 1014-32. 1984.
- FINKMEIR, C. G.. **Bone-grafting and bone-graft substitutes**, *J. Bone Joint Surg.* 84(3): 454-65, 2002.
- GOISSIS, G.; PARREIRA, D. R.. **A study on the biocompatibility and integration of acellular polyanionic collagen:elastin matrices by soft tissue**. *Rev. Bras. Eng Biomed.* 19(3):197-173.2003.
- MAIZATO, M. J.; PIRES, M. D.; CANZIAN, M.; HIGA, O. Z.; PITOMBO, R. N.; LEIMER, A. A.. **Histological evaluation of biocompatibility of lyophilized bovine pericardium implanted subcutaneously in rats**. *Artif Organs.* 2008 Apr;32(4):268-71.
- MANN, S.. **The study of biominerals by high resolution transmission electron microscopy**. *Scan Electron Microsc.* 2: 393-413, 1986.
- MORETTI NETO, R. T.; MELLO, I.; MORETTI, A. B.; ROBAZZA, C. R.; PEREIRA, A. A.. **In vivo qualitative analysis of the biocompatibility of different cyanoacrylate-based adhesives**. *Braz Oral Res.* jan-mar 2008;22(1):43-7.
- MRUE, F.; NETTO, J. C.; CENEVIVA, R.; LCHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H.. **Evaluation of The Biocompatibility of a New Biomembrane**. *Materials Research* 7(2):277-283, 2004.
- MURAYAMA, E.; YAKAGI, Y.; NAGASAWA, H. I.. **Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts**. *Histochem.* 121(2):155-66. 2004.
- MURAYAMA, E.; YAKAGI, Y.; OHIRA, T.; DAVOS, J. G.; GREENE, M. I.; NAGASAWA, H. I.. **Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1**. *Eur J Biochem.* 2002 269(2): 688-96.
- PERRY, C. C.; PATWARDHAN, S. V.; DESCHAUME O.. **From biominerals to biomaterials: the role of biomolecule–mineral interactions**. *Biochem Soc Trans.* 2009 aug; 37(Pt 4):687-91.
- RUSSELL, R. G. G.; CASWELL, A. M., HEAM, P. R.; SHARRARD, R. M.. **Calcium in mineralized tissues and pathological calcification**. *British Medical Bulletin* 42:435-446,1986.
- SERVICE R. F.. **Tissue engineers build new bone**. *Science*, 289: 1498-500, 2000.
- TOHSE, H.; YAKAGI, Y.; NAGASAWA, H. I.. **Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths**. *FEBS J.* 2008 275(10):2512-23.
- YULING, Jamie Han, SAY, Chye Joachim Loo, JOEL, Lee; JAN, Ma. **Investigation of the bioactivity and biocompatibility of different glass interfaces with hydroxyapatite, fluorohydroxyapatite and 58S bioactive glass**. *BioFactors.* 30(4):2007 205-216

CAPÍTULO III
ARTIGO CIENTÍFICO
**UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* EM
ENSAIOS BIOLÓGICOS DE REPARO ÓSSEO**

**Dênison Pereira da Silva¹, Sonia Oliveira Lima², Ricardo Luiz Cavalcanti de
Albuquerque Júnior^{2,3}, Lauro Xavier Filho^{2,3}**

¹ Aluno do Mestrado em Saúde e Ambiente/UNIT, Aracaju/SE;

² PhD Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju/SE;

³ Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju/SE.

RESUMO

Otólitos são concreções calcárias presentes no ouvido interno de peixes. Posto que são ricos em minerais considerados essenciais ao processo de mineralização óssea, assim em uma matriz protéica (otolina), tem sido sugerido que otólitos poderiam funcionar como biominerais. Portanto, este estudo objetivou analisar a dinâmica da regeneração de defeitos ósseos tratados com preparado gelatinoso estéril de otólitos. Desta forma, defeitos ósseos artificiais foram realizados no fêmur de 20 ratos *Wistar*, divididos em 02 grupos: grupo controle (CTL), cujas lojas ósseas não recebera, qualquer tratamento adicional; e grupo experimental (OTL), cujas lojas ósseas foram preenchidas com o preparado de otólitos. Os animais foram sacrificados 14 dias após os procedimentos cirúrgicos; os fêmures foram removidos e realizadas imagens radiográficas dos defeitos ósseos produzidos nos grupos CTR e OTL. Utilizou-se software ImageTool (UTHSCSA ImageTool, versão 3.0) para as avaliações radiográficas. Posteriormente foram fixados em formalina, descalcificados em ácido nítrico a 0,5% e processados histologicamente. Antes dos sacrifícios, foram coletadas amostras sanguíneas para avaliação das dosagens séricas de cálcio (Ca) e fosfatase alcalina (ALKP), assim como dos parâmetros hematológicos convencionais (hemograma). As secções histológicas revelaram que o trabeculado ósseo neoformado mostrou-se mais denso, e com atividade osteorreabsortiva periosteal menos conspícua em OTL. Contudo, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na área de neoformação óssea entre CTL ($1,5 \pm 0,4\text{mm}^2$) e OTL ($1,9 \pm 0,3\text{cm}^2$) ($p=0,0617$). Os parâmetros bioquímicos (Ca e ALKP) e hematológicos se encontravam dentro dos limites de normalidade, exceto por moderada monocitose observada em CTL. Na avaliação radiográfica foi observada a presença de barreira mineralizada nos grupos: (CTR 76,65 e OTL 84,45), contudo, houve diferença estatística significativa ($p = 0,021$). Os dados sugerem que os otólitos podem desempenhar um papel adjuvante na dinâmica da regeneração óssea.

Palavras-chave: Otólitos, Neoformação Óssea, Biominerais.

ABSTRACT

Concrescence calcareous otoliths are present in the inner ear of fish. Assuming they are rich in minerals considered essential to the process of bone mineralization, then in a protein matrix (otolina) has been suggested that otoliths could work as biominerals. Therefore, this study aimed to analyze the dynamics of regeneration of bone defects treated sterile jelly prepared otoliths. From this, artificial bone defects have been made in the femur of 20 Wistar rats, divided in 02 groups: control (CTL) whose bone stores had not received any additional treatment, and experimental group (OTL), whose stores have been filled with bone prepared otoliths. The animals were sacrificed 14 days after surgery; the femurs were removed and performed radiographic images of bone defects produced in the CTR groups and OTL. We used Image Tool software (UTHSCSA Image Tool, version 3.0) for radiographic evaluation. After that, they were fixed in formalin, decalcified in nitric acid 0.5% and histologically processed. Before euthanasia, blood samples were collected for calcium serum (Ca) evaluation and alkaline phosphatase (ALKP) as well as conventional hematological parameters (blood count). The histological sections revealed the newly formed trabecular bone was more dense and periosteal bone resorption activity less conspicuous in OTL. However, there were no statistically significant differences were found in the area of bone between newly formed CTL ($1.5 \pm 0.4 \text{ mm}^2$) and OTL ($1.9 \pm 0.3 \text{ cm}^2$) ($p = 0.0617$). Biochemical parameters (Ca and ALKP) and hematology were in normal limits except for moderate monocytosis observed in CTL. Radiographic evaluation was observed in the presence of mineralized groups: (CTR 76.65 and 84.45 OTL), however, there is statistically significant difference ($p = 0,021$). These data suggest to may play an adjunctive role in the dynamics of bone regeneration.

Keywords: otoliths, newly bone formation, biominerals.

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é frequentemente acometido por defeitos provocados por traumatismo, patologias de origens e comportamentos variados, infecções e deformidades congênitas (LEONEL *et al.*, 20041). O reparo de tais defeitos ósseos continua representando um desafio, onde métodos tradicionais de tratamento lançam mão do enxerto ósseo autógeno, especialmente por sua propriedade osteogênica e facilidade de incorporação em relação aos enxertos homogêneos e xenógenos. Ressalta-se, contudo, que a aquisição de enxerto ósseo autógeno agrega alguns riscos ao paciente, a exemplo de incisão cirúrgica adicional, aumento da morbidade pós-operatória, debilitação do local doador e disponibilidade de quantidade insatisfatória de material para enxerto (FINKEMEIER, 2002). Em vista destas dificuldades, uma grande variedade de materiais alternativos para preenchimento de defeitos ósseos, denominados biomateriais, tem sido desenvolvida (FIGUEIREDO, 2001; KALISH *et al.*, 2008).

Os biomateriais caracterizam-se por sua biocompatibilidade e atoxicidade, além de não apresentarem carcinogenicidade e exibirem resistência mecânica, elasticidade e estabilidade química e biológica (GARCIA JR, 2000). Biomateriais inorgânicos são, por sua vez, compostos alternativos ao uso de enxertos ósseos autógenos por serem produzidos com propriedades potencialmente semelhantes às do tecido receptor e, quando usados em defeitos ósseos longos, constituem elementos capazes de promover ou auxiliar a neoformação óssea, por mecanismos de osteoindução e/ou osteocondução (SERVICE, 2000). Ressalta-se, ainda, que Borelli *et al.* (2003) demonstraram que a presença de uma matriz orgânica acelera a neoformação óssea por facilitar a incorporação de minerais por difusão passiva.

Dentre os diversos biomateriais com provável atividade sobre a neoformação óssea, merece destaque o grupo dos biominerais. Estes representam tecidos duros que consistem basicamente de compostos inorgânicos e, entre suas funções, citam-se a manutenção da estrutura corporal, proteção, estocagem de minerais, entre outras (MANN, 2003). Tais biominerais consistem de uma fase predominantemente mineral incorporada a uma matriz orgânica que, representada por uma rede complexa de glicoproteínas, proteoglicanas e proteínas colagênicas e não colagênicas (LOWENSTAM; WEINER, 1989); assim, a superfície das partículas dos biomateriais atua como uma matriz sobre a qual a reparação óssea se desenvolve (ELLIS; SINN, 1993).

Otólitos concreções calcárias do ouvido interno dos peixes ósseos e constituem parte de um sistema que atua como sensor de profundidade e equilíbrio, assim como detector de vibrações sonoras (BASTOS, 1990). Estudos vêm demonstrando que otólitos são ricos em carbonato de cálcio, elementos metálicos (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K, etc) e não metálicos (Si, P, S, B, etc.) (CAMPANA; NELSON, 1985), e em uma proteína colagênica de alto peso molecular denominada otolina (MURAYAMA *et al.*, 2002; BORELLI *et al.*, 2003; MURAYAMA *et al.*, 2004; TOHSE *et al.*, 2008).

Admite-se, pois, que otólitos poderiam representar um excelente exemplo de biomineral, uma vez que apresentam uma porção inorgânica rica em elementos essenciais ao processo de mineralização, bem como uma porção protéica (otolina), que poderia funcionar como matriz orgânica. Assim, dentro desta perspectiva, propusemo-nos a estudar o comportamento da regeneração do tecido ósseo perdido, em defeitos ósseos artificialmente induzidos, preenchidos com um preparado gelatinoso estéril de otólitos, a fim de avaliar a influência de biominerais (Cynoscion acoupa) no processo de neoformação óssea.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Preparado de Otólitos:

Cerca de 100g de otólitos de Pescada Amarela foram triturados em almofariz até se obter um pó de granulação delicada e coloração esbranquiçada. O composto final foi diluído em gelatina incolor, acondicionado em placas de petri e esterilizado em raios gama/cobalto 60.

2.2 Experimentação em Animais

Foram utilizados 20 (vinte) ratos machos de linhagem Wistar, com peso médio de 300g (\pm 50g), distribuídos em dois grupos com 10 (dez) animais: grupo controle (CTL) e grupo experimental (OTL). Para confecção do defeito ósseo, os animais foram anestesiados com solução 1:1 de xilazina e quetamina, na dosagem de 0,1mL x100g⁻¹ de peso, por via intramuscular. Após tricotomia e antissepsia com povidine, foi realizada uma incisão cutânea longitudinal de 20 mm em face lateral da coxa, divulsão romba da musculatura com exposição da diáfise da tíbia e confecção do defeito na porção proximal da superfície óssea com broca metálica.

Os animais do grupo CTL não receberam qualquer tratamento adicional à confecção dos defeitos, enquanto os do grupo OTL, os defeitos foram preenchidos com o preparado de otólitos. A aproximação muscular foi efetuada com pontos simples de catagute 3-0 e sutura contínua da incisão cutânea com fio monofilamentado de poliamida 4-0. Os animais foram mantidos em gaiolas com ração e água *ad libitum*, sem nenhum recurso de imobilização externa do membro operado. No décimo quarto dia após a cirurgia, os animais foram mortos com injeções intramuscular de zoletil (0,8ml/kg), tio-Pental (0,43 ml/kg) e cloreto de Potássio (5ml/kg). Em seguida, foi realizada a remoção do espécime ósseo.

2.3 Hemograma e Dosagem Sérica de Cálcio e Fosfatase Alcalina

Coletou-se 600 μ l de sangue, obtidos por punção da veia mesentérica superior. Cerca de 300 μ l foi armazenado em tubos estéreis e, depois da coagulação, o soro foi separado por centrifugação em tubos eppendorf a 1000g. A atividade enzimática da fosfatase alcalina sérica foi determinada, utilizando-se 25 μ l de soro, e a absorvância foi determinada a 590nm. Os

300µl restantes foram armazenados em tubos heparinizados e seguiram para determinação dos valores do hemograma (série vermelha e branca). Para dosagem sérica de cálcio foi utilizado 20µl do soro coletado e submetido à espectrofotometria com absorvância de 570nm.

2.4 Análise Radiográfica

O aparelho de raios X utilizado foi o Gendex 765DC, operando em 65 kVp, 7 mA, utilizando-se distância foco-sensor de 40 cm e tempo de exposição de 0,02 segundos, com feixe central de raios X direcionado de forma a incidir perpendicularmente ao sensor.

Para a digitalização das radiografias, utilizou-se um scanner de mesa ScanMaker 9800XL, fabricado nos Estados Unidos, pela Microtek International, 2003, com resolução óptica máxima de 1600 x 3200dpi, sensor CCD (Charge-coupled device), conversor A/D de 48 bits, equipado com um leitor de transparência (Transparent Media Adapter – TMA 1600). As radiografias foram digitalizadas em 600dpi, 8 bits, na escala de tons de cinza, e armazenadas no formato TIFF, sem compactação da imagem, na ordem de bits para PC-IBM.

Para a leitura da densidade óptica, representada pelos valores de pixels, nas áreas determinadas das radiografias digitalizadas, as imagens foram exibidas na tela do monitor em 100% do seu tamanho, facilitando a visualização, não sendo realizado qualquer tipo de ajuste na imagem para a obtenção dos valores de pixels das áreas selecionadas.

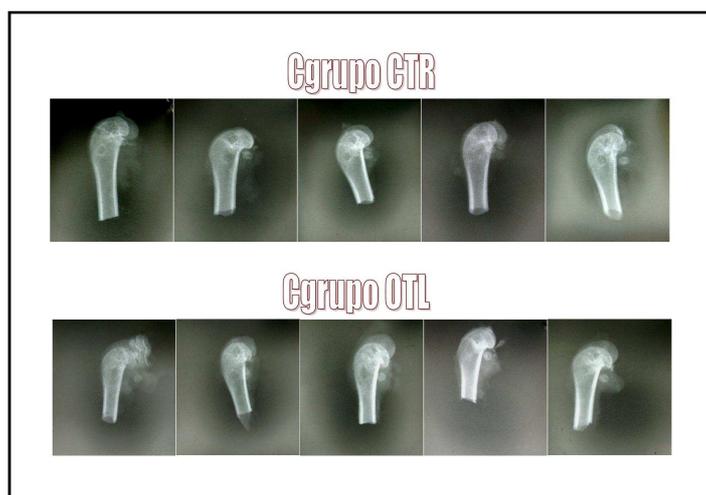


Figura 02 - Imagens radiográficas do defeito ósseo produzido nos grupos CTR e OTL após 14 dias. Observar maior radiopacidade do defeito no grupo experimental (OTL).

Foi utilizado software ImageTool (UTHSCSA ImageTool, versão 3.0). Depois de demarcada a área de leitura, o programa forneceu o histograma, demonstrando a média dos valores dos pixels contidos na área demarcada. Os valores apresentados são referentes à

representação numérica dos pixels dentro da escala de cinza, que varia de 0 (zero), representando a cor preta, a 200, representando a cor branca.

2.5 Análise Morfológica

Os espécimes removidos foram fixados em solução de formol tamponada (tampão fosfato, pH 7,4) por 24 horas e, subsequentemente, foi submetido a protocolo específico para descalcificação em ácido nítrico. Após descalcificação, os espécimes ósseos foram hemisseccionados em seu longo eixo, e submetido ao processo de rotina para inclusão em parafina. Secções histológicas de 5µm de espessura do material embocado foram obtidas e coradas em Hematoxilina/Eosina (HE) para análise morfológica e morfométrica do tecido mineralizado neoformado na área da osteotomia.

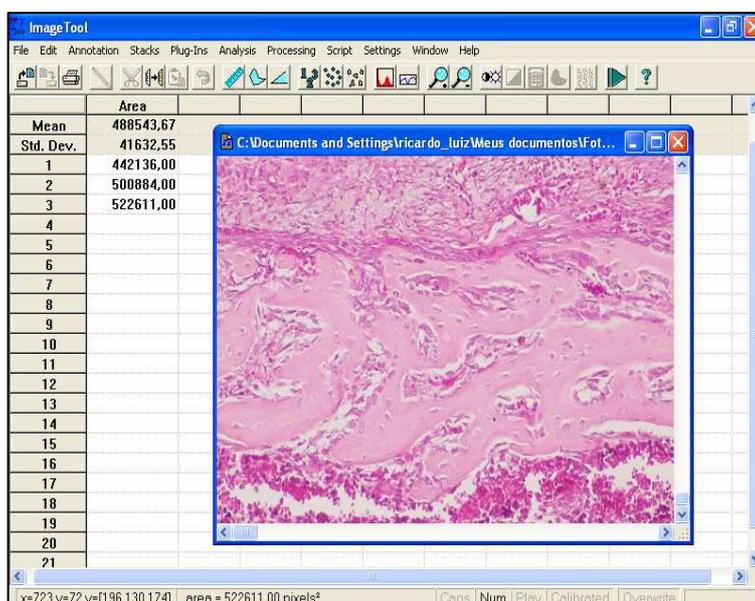


Figura 03 - Tela aberta do software Image Tool® durante procedimento de análise morfométrica da área de neoformação óssea nos grupos estudados.

2.6 Análise Estatística

Para operacionalização deste estudo, foram confeccionadas 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm; em cada lâmina foram fotomicrografados 04 campos histológicos (ampliação de 400x), selecionados de modo a perfazer toda a área de neoformação óssea. As imagens fotomicrografadas foram digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000®, projetadas em monitor Samsung® de 14", e submetidas a processamento e software específico para morfologia (Image Tool®) para determinação do valor total da área ocupada

pelo tecido ósseo depositado na região correspondente a ferida óssea artificialmente induzida (Figura 03). Para tanto o programa foi calibrado para que os valores fossem obtidos em micrometros quadrados (μ^2).

As médias dos valores da dosagem de fosfatase alcalina sérica e as médias da área de neoformação óssea foram comparadas entre os grupos experimental (grupo 1) e controle (grupo 2) por meio do teste T de *student*. Os valores obtidos no hemograma foram comparados entre os grupos por intermédio do teste *chi*-quadrado. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de P fosse inferior a 0,05.

O Projeto intitulado Estudo preliminar do efeito da utilização de otólitos de *Cynoscion Acoupa* sobre o processo de neoformação óssea em ratos, sob a responsabilidade do pesquisador Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior foi submetido ao Comitê de Ética em 17/12/2006, tendo o seu parecer favorável no que se refere a seus aspectos éticos, em 10/02/2007, em face de sua alta relevância para a comunidade científica e população de maneira geral.

2.7 Resultados

Em todos os casos, foi observada a neoformação de trabéculas ósseas, a maioria com aparência irregular, aspecto intensamente entrelaçado e espessura delgada. As trabéculas estendiam-se, de forma geral, de um lado a outro do defeito ósseo artificialmente induzido, e exibiam atividade osteoblástica bastante proeminente. Os espaços medulares exibiam escassa infiltração inflamatória e apresentavam-se bastante estreitados, especialmente no grupo tratado com otólitos (Figuras 04 e 05).

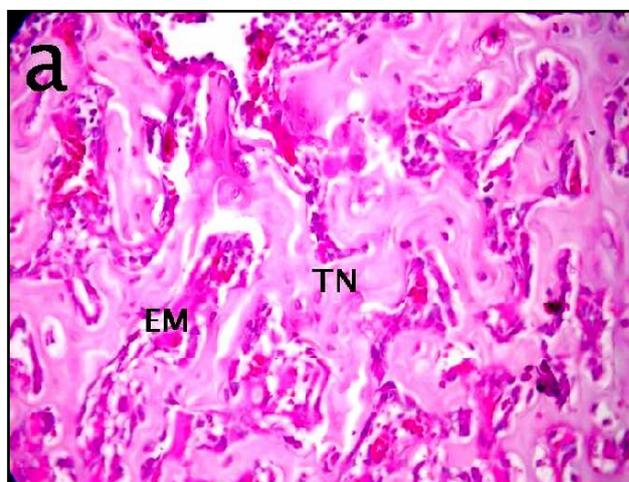


Figura 04 - Área osteotomizada exibindo trabéculas ósseas irregulares delgadas e entrelaçadas (TN) e espaços medulares estreitados (EM) no grupo controle

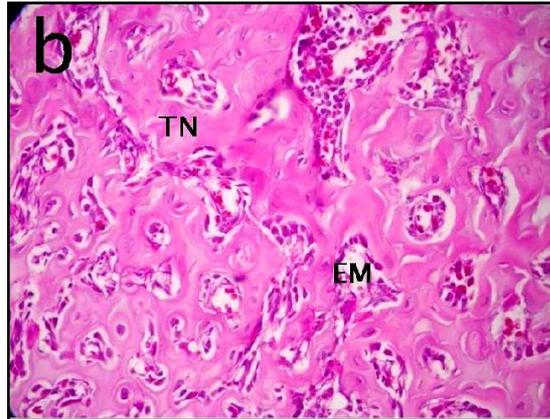


Figura 05 - Área osteotomizada exibindo trabéculas ósseas irregulares delgadas e entrelaçadas (TN) e espaços medulares estreitados (EM) no grupo experimental

O perióstio, por sua vez, mostrava grau moderado de fibrose em ambos os grupos. No entanto, a superfície do tecido ósseo se apresentou mais regular e com atividade osteoblástica mais conspícua no grupo experimental do que no controle; além disso, o último exibiu áreas de atividades osteorreabsortiva mais evidentes. (Figuras 06 e 07).

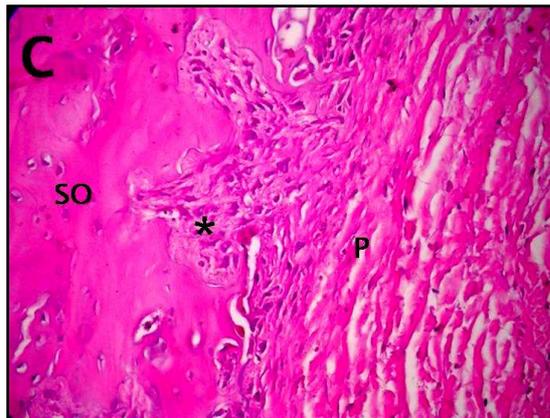


Figura 06 - Observar tendência a um maior estreitamento dos últimos em relação aos primeiros. O perióstio (P) exibe fibrose em ambos os grupos, mas a superfície óssea (SO) mostra mais irregularidade no grupo de controle, inclusive com áreas de expressiva reabsorção óssea (*), que no experimental (HE, 100x)

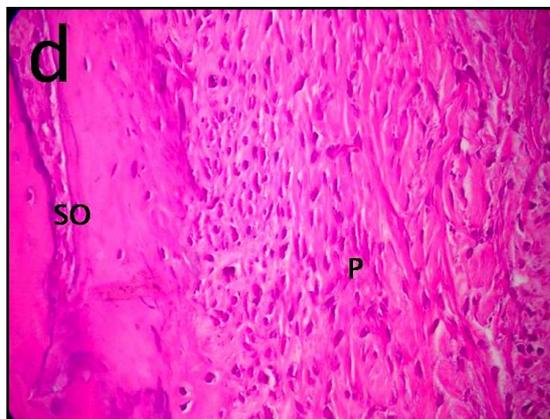


Figura 07 - Observar tendência a um maior estreitamento dos últimos em relação aos primeiros. O perióstio (P) exibe fibrose em ambos os grupos, mas a superfície óssea (SO) mostra mais irregularidade no grupo de controle, inclusive com áreas de expressiva reabsorção óssea (*), que no experimental (HE, 100x)

A área média de neoformação óssea nos animais do grupo experimental foi de 1906858,5 (\pm 397647,9) e de 1557682,1 (\pm 425608,2) no grupo controle (Gráfico 01). Apesar da tendência a uma maior área de neoformação óssea no grupo experimental, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,06$).

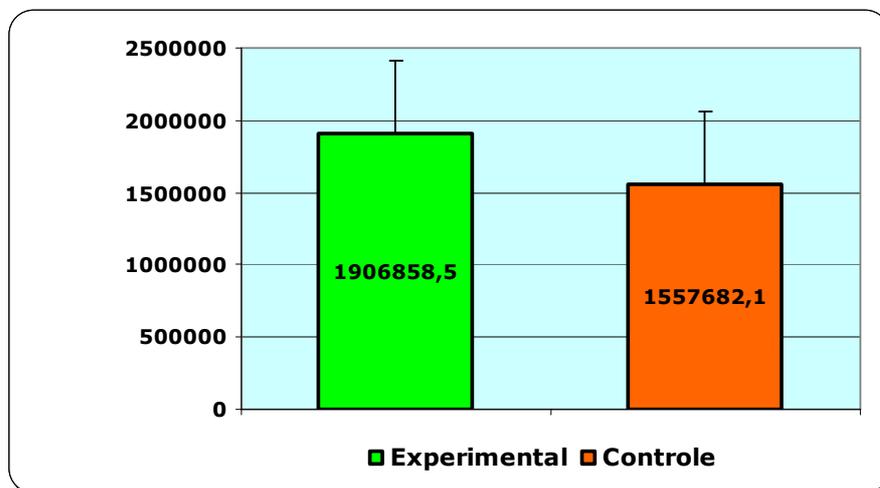


Gráfico 01 - Análise morfométrica da área de neoformação óssea na região osteotomizada (μ^2) nos grupos experimental e controle.

A análise dos parâmetros bioquímicos demonstrou que a média da dosagem de cálcio foi de 9,05 (\pm 0,47) mg/dL para o grupo experimental e 8,79 (\pm 0,33) mg/dL para o controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,08$). Além disso, os valores se mantiveram dentro da faixa de normalidade (8 -13 mg/dL).

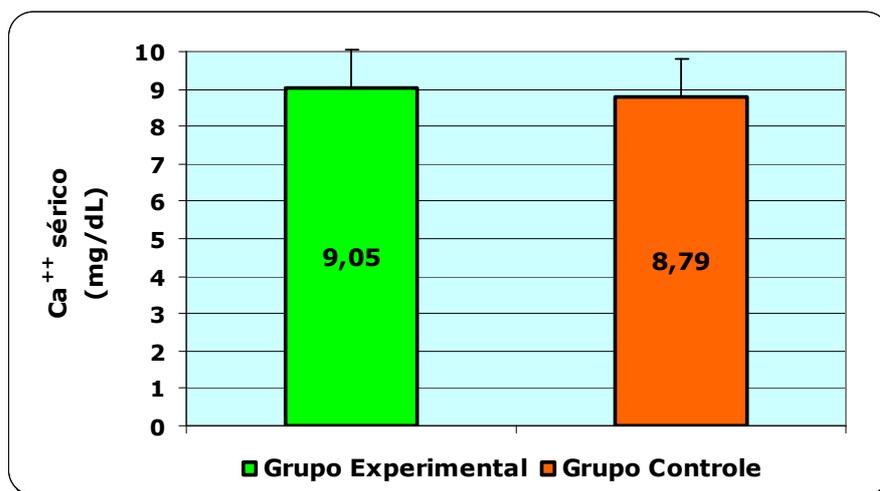


Gráfico 02 - Dosagens séricas de cálcio nos grupos experimental e controle.

Já a análise dos níveis séricos de fosfatase alcalina mostrou valores bastante elevados em ambos os grupos (152,3 \pm 23,68 U/L no grupo experimental, e 136,5 \pm 29,51 U/L no grupo controle), quando comparados ao parâmetro sérico normal ou basal (16-50 U/L). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,12$).

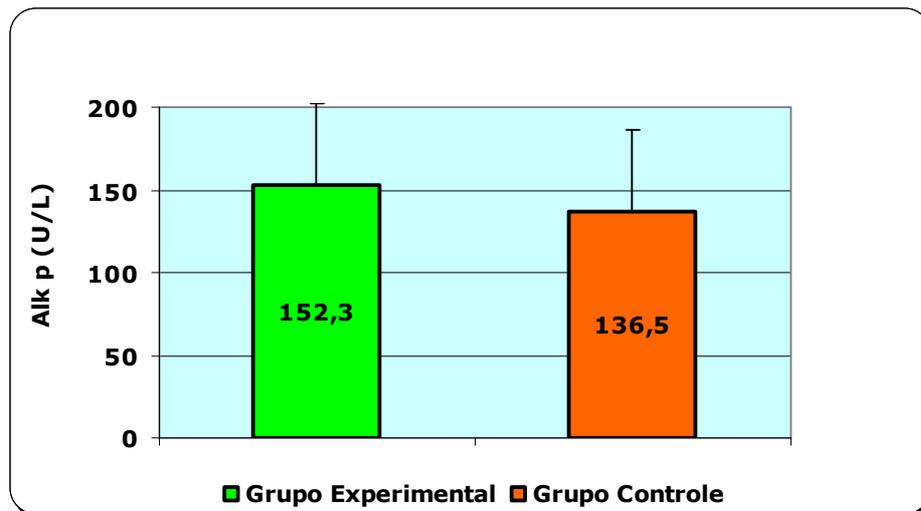


Gráfico 03 - Dosagens séricas de fosfatase alcalina (Alk p) nos grupos experimental e controle

A análise dos parâmetros hematológicos referentes a série branca revelou poucas alterações no grupo nos leucócitos mononucleares, representada por monocitose moderada em ambos os grupos. Granulócitos e linfócitos não exibiram variações importantes, apesar dos últimos se apresentarem no limite da faixa de normalidade (Tabela 01). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o valor sérico relativo de monócitos ($p = 0,001$) e neutrófilos ($p = 0,001$), mas não para linfócitos ($p = 0,336$). Por outro lado, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quando foram comparados os parâmetros hematológicos da série vermelha, que se mostraram mais elevados no grupo experimental, excetuando a contagem de plaquetas (PLT), onde ocorreu o fenômeno inverso ($P < 0,05$) (Tabela 02). No entanto, os parâmetros se encontravam dentro do limite de normalidade, excetuando o volume corpuscular médio (VCM), que estava diminuído.

Tabela 01 - Distribuição dos valores hematológicos da série leucocitária nos animais dos grupos Controle e Experimental.

Animais	Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Granulócitos (%)	
	GC	GE	GC	GE	GC	GE
01	58,4	56,9	25,2	12,2	16,4	30,9
02	69,1	62,5	12,1	8,5	18,8	29
03	66,1	67,7	16,9	8,3	17	24
04	64	52,3	16,8	12,6	19,2	35,1
05	64,2	65,4	14,6	9	21,2	25,1
06	61,5	50,5	17,2	9,8	21,3	39,7
07	72,9	69,3	13,6	8,9	13,5	21,8
08	61,5	69,5	19,1	10,1	19,4	20,4
09	-	61,9	-	9,6	-	28,5
10	-	-	-	-	-	-
Média	64,7±4,6	61,7±7,1	16,9±4,1	9,8±1,543	18,3±2,6	28,2±6,2
Valor de P	0,336		0,001		0,001	
Referência	60 a 80		0 a 5		10 a 30	

GE – grupo experimental; GC – grupo controle.

Tabela 02 - Distribuição dos valores hematológicos relativos da série eritrocítica nos animais dos grupos Controle e Experimental

Animais	RBC (10 ⁶ /mm ³)		HGB (g/dl)		HCT (L %)		VCM (L μm ³)		PLT (10 ³ /mm ³)	
	GC	GE	GC	GE	GC	GE	GC	GE	GC	GE
R1	6,8	5,98	13,4	14,4	31,7	39,9	49	53	801	415
R2	5,88	7,44	12,9	13,2	32,2	37,4	50	51	755	772
R3	6,03	7,45	12,7	14,2	30,2	37,8	51	52	728	498
R4	5,39	7,38	12,7	14,6	31,1	36,6	50	54	714	475
R5	6,19	7,35	13,1	13,5	29,1	39,5	51	51	646	595
R6	6,04	7,42	13,1	14,4	31,7	37,7	48	53	652	415
R7	5,88	6,89	13,9	13,2	32,2	40,6	51	51	615	772
R8	6,03	7,1	13,7	14,2	30,2	41	52	52	532	498
R9	5,39	6,07	15,1	14,6	31,1	46	51	54	752	475
R10	6,19	6,8	13	13,5	29,1	39,4	50	51	645	595
Média	59,82±0,4	69,88±0,55	13,36±0,72	13,98±0,56	30,86±1,16	39,59±2,68	50,3±1,159	52,2±1,22	684±80,3	551±131,53
Valor P	0,0002		0,04		0,000		0,002		0,01	
	4,5 – 5,5		13 – 18		13 – 18		80 – 85		550 – 650	

RBC – contagem de hemáceas; HGB – dosagem de hemoglobina; HCT – hematócrito; VCM – volume corpuscular médio; PLT – contagem de plaquetas, GC – Grupo de controle; GE – Grupo experimental.

Após a avaliação radiográfica (Gráfico 04), foi observado, em 14 dias, presença de barreira mineralizada em 100% dos espécimes de ambos os grupos experimentais (CTR: 76,65 e OTL: 84,45). No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,021$).

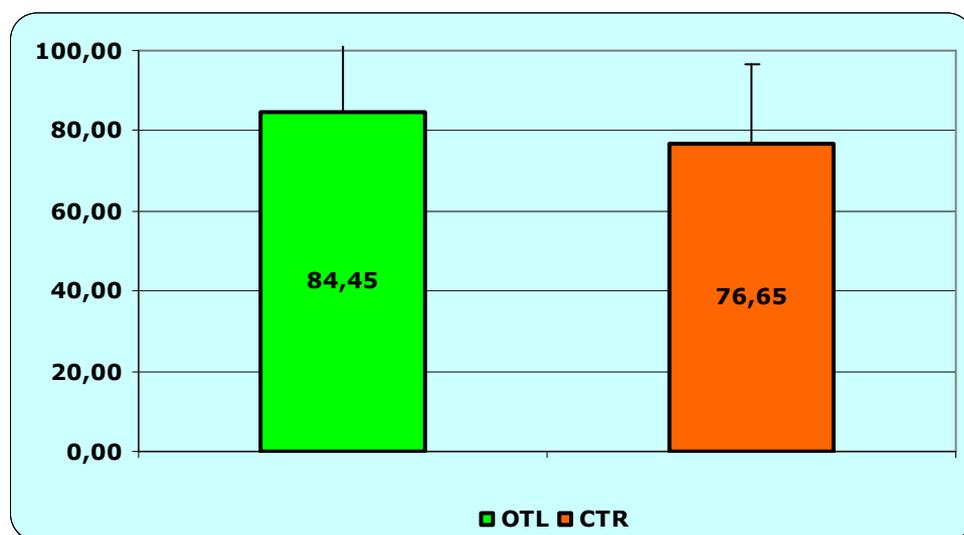


Gráfico 04 - Densidade radiográfica otólitos e controle

Tabela 03 - Densidade radiográfica otólitos e controle

CTR	OTL	Teste F: duas amostras para variâncias		
62	78			
74	81		Variável 1	Variável 2
70,5	80,5	Média	76,75	84,45
88	98,5	Variância	54,73611	38,58056
84,5	88	Observações	10	10
73,5	86,5	Gl	9	9
76	83	F	1,418749	
81,5	77,5	P(F<=f) uni-caudal	0,305354	
79	88	F crítico uni-caudal	3,178893	
78,5	83,5			

			Teste T: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
Média	76,75	84,45			
DP	7,398386	6,211325	Variável 1	Variável 2	
			Média	76,75	84,45
			Variância	54,73611	38,58056
			Observações	10	10
			Variância agrupada	46,65833	
			Hipótese da diferença de média	0	
			gl	18	
			Stat t	-2,52064	
			P(T<=t) uni-caudal	0,010685	
			t crítico uni-caudal	1,734064	
			P(T<=t) bi-caudal	0,02137	
			t crítico bi-caudal	2,100922	

3 DISCUSSÃO

O tecido ósseo possui grande potencial regenerativo, com a condição de restaurar completamente sua estrutura e funções originais sem deixar cicatriz, porém, em algumas situações, os defeitos ósseos não são reparáveis por si só (LINDHEN *et al.*, 1999). Quando ocorre perda óssea substancial, seja de origem cirúrgica ou patológica, torna-se indispensável a utilização de manobras clínicas e terapêuticas para correção estética e funcional, como enxertos ou emprego de compostos biominerais implantáveis (GARCIA JR, 2000; KALISH *et al.*, 2008).

Os materiais implantares e enxertos ósseos podem atuar através de três diferentes mecanismos: osteogênese, que se refere ao material orgânico capaz de formação óssea diretamente a partir dos osteoblastos; a osteoindução, em que todo material é capaz de induzir à transformação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando, assim, o crescimento ou podendo formar osso onde não é esperado; e a osteocondução, que vem a ocorrer quando um material, frequentemente inorgânico, permite aposição óssea sobre osso preexistente, requerendo a presença de osso e células mesenquimais diferenciadas. Um material osteocondutivo sob tecido mole não produzirá neoformação óssea (SERVICE, 2000). Otólitos apresentam uma composição físico-química e estrutural que os torna consistentes, com biominerais aptos a promoverem osteocondução (CAMPANA; NEILSON, 1985; MURAYAMA *et al.*, 2002; BORELLI *et al.*, 2003; MURAYAMA *et al.*, 2004; TOHSE *et al.*, 2008).

No presente estudo, os defeitos ósseos tratados com otólitos exibiram a neoformação de trabéculas ósseas cujos espaços medulares estavam mais estreitados que no grupo controle. Há de ser considerado que o estreitamento dos espaços medulares ocorre a expensas da mineralização acelerada do osteóide na porção interna das trabéculas. Assim, uma vez que os otólitos representam verdadeiros reservatório de minerais (CAMPANA, NEILSON, 1985), esse achado morfológico poderia estar refletindo a maior velocidade de mineralização do osteóide medular, secundária à disponibilização de minerais oferecidos pelos otólitos.

No entanto, essa teoria deve ser encarada com bastante parcimônia, já que houve diferença estatisticamente significativa na área média de neoformação óssea entre os grupos. Esses dados sugerem que o uso de otólitos não pareceu aumentar a síntese de matriz osteóide, com consequente aumento do volume ósseo, mas apenas facilitar a

mineralização da matriz pré-existente. Esse expediente poderia promover leve estreitamento dos espaços medulares sem, contudo, alterar significativamente a área ou volume ósseo total.

Observou-se ainda fibrose periosteal que, provavelmente, ocorreu em resposta ao reparo cicatricial que tomou sede neste tecido após a injúria em ambos os grupos. Contudo, a margem óssea periosteal mostrou-se nitidamente menos regular no grupo controle onde a visualização de áreas de reabsorção intercaladas por zonas de aposição era indiscutivelmente mais aparente. O grupo experimental, por outro lado, apresentou superfície periosteal regular, com discreta atividade osteoblástica e atividade osteoclástica inconspícua.

A interpretação desses dados requer a compreensão de que a persistência de atividade blástica/clástica relevante, sem sinais flogísticos evidentes, é forte indicativo de elevada neoformação óssea (VIEIRA, 2007). Sugere-se, pois, que o grupo controle, aos 14 dias, ainda demonstrava sinais morfológicos de atividade remodeladora do tecido ósseo periosteal característico das fases tardias do processo de reparação óssea (WISHART *et al.*, 1999). Por outro lado, a evidente regularidade da margem periosteal no grupo experimental é um indício importante de que, neste grupo, a atividade remodeladora é menos conspícua. Esse achado poderia refletir tão-somente o fato de que a presença dos otólitos e, conseqüentemente, a disponibilidade local aumentada de minerais essenciais à mineralização óssea, pode ter atuado como um co-fator que aceleraria a dinâmica da neoformação óssea.

A dosagem sérica de cálcio apresentou-se estatisticamente similar em ambos os grupos, e dentro dos parâmetros de normalidade. A dosagem do cálcio no sangue é empregada, principalmente, para avaliar o comportamento do metabolismo do cálcio no organismo. De forma geral, valores altos são encontrados no hiperparatireoismo, hipervitaminose D, doença de Paget e doenças malignas com comprometimento ósseo. Valores baixos são encontrados no hipoparatiroidismo, deficiência de vitamina D, nefropatias, má absorção intestinal, osteomalácia e transfusões maciças.

No presente estudo, a dosagem de cálcio foi realizada a fim de observar o comportamento deste íon no reparo do tecido ósseo, mas não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Contudo, é importante destacar que o cálcio sérico circula sob duas formas principais: o cálcio ionizado (que exerce a ação biológica) e o cálcio ligado a proteínas e

complexado; o primeiro corresponde, em circunstâncias normais, a 52% do total e o segundo, a 48%. É patente que qualquer alteração do nível de proteínas séricas, em especial da albumina, pode determinar alterações do conteúdo total de cálcio no soro, sem que isso implique uma alteração da fração ionizada. Vale aqui o mesmo raciocínio desenvolvido quando se discute a avaliação de hormônios livres. Outro fator que leva a alterações das porcentagens entre o cálcio ionizado e o ligado é a concentração de íon hidrogênio (pH), mas, na acidose, há tendência a uma menor ligação do cálcio às proteínas. Em vista disso, em uma série de circunstâncias clínicas, a dosagem de cálcio total não fornece informação fidedigna quanto à calcemia funcional (VIEIRA, 2007).

Depreende-se, pois, que a despeito da natureza dos resultados obtidos neste estudo acerca da dosagem sérica de cálcio, inferências sobre a da relação entre a calcemia e o reparo ósseo nos grupos estudados, por si só, teriam pouca relevância, exceto em casos em que o tratamento tivesse efeitos sistêmicos e conduzisse a distúrbios na mobilização do cálcio.

Por outro lado, sabe-se que, durante a formação óssea, a produção da matriz colágena precede a mineralização e coincide com a maior produção de fosfatase alcalina (STEIN; LIAN, 1993); dessa forma, a dosagem sérica de tal enzima pode oferecer subsídios importantes para o entendimento do metabolismo ósseo, e níveis elevados desta indicam atividade osteoformativa importante (VIEIRA, 2007).

No presente estudo, ambos os grupos exibiram níveis séricos elevados de fosfatase alcalina, sugerindo que o processo de formação e remodelação óssea ainda estava plenamente ativo no período de sacrifício (14 dias). No entanto, a ausência de significância estatística vem sugerir que a utilização de otólitos não alterou o padrão de deposição de matriz colagênica osteóide na região de reparo. Esses dados parecem ratificar o fato de que a área total de osso neoformado não foi diferente entre os grupos, e que o maior estreitamento medular poderia ser apenas resultado de uma mineralização mais rápida, em virtude da disponibilidade local de o cálcio ter sido maior no grupo tratado com otólitos.

A avaliação hematológica revelou que ambos os grupos mostraram monocitose, e que esta foi significativamente maior no grupo controle, sugerindo maior mobilização de precursores mononucleares de fagócitos neste grupo.

Deve ser considerado que os monócitos são, em última instância, precursores séricos das células mononucleares fagocitárias que, ao formar sincícios por ação parácrina

de citocinas derivadas de outros leucócitos ou de células mesenquimais residentes no sítio de injúria do tecido ósseo, irão originar os osteoclastos (DAY *et al.*, 2000). Seria lícito, portanto, sugerir a potencialidade para maior atividade osteoclástica (osteorreabsortiva) no grupo controle do que no experimental.

De certa forma, esses achados pareceram corroborar com aqueles observados no estudo morfológico, uma vez que áreas de reabsorção óssea ativa foram evidenciadas com maior frequência na superfície periosteal dos animais do grupo controle. É possível sugerir, portanto, que o grupo controle ainda apresenta, aos 14 dias, elevado *turnover* ósseo, que poderia estar relacionado à remodelação do tecido ósseo na área de reparo, enquanto no grupo experimental a fase mais ativa de remodelação já teria passado. Esse fenômeno, no entanto, ainda é mera especulação, sendo necessários estudos posteriores para validar esta teoria, assim como se existe alguma relação entre ela e a maior disponibilidade de cálcio promovida pelo uso de otólitos.

Os demais leucócitos mantiveram-se dentro da faixa de normalidade, indicando que não havia nenhum processo inflamatório ativo aos 14 dias em nenhum dos grupos. Surpreendentemente, o grupo experimental exibiu valores estatisticamente superiores para granulócitos (especialmente neutrófilos), quando comparados ao controle. O real significado clínico dessa diferença é de difícil interpretação; este pode representar a fase final (de remissão) de um processo inflamatório agudo deflagrado em etapas anteriores pelo material implantado. No entanto, o padrão de neoformação óssea observado no grupo experimental não parece suportar essa teoria, já que seria esperado um retardo na reparação óssea se tivesse sido instalada uma inflamação aguda prévia. Por outro lado, a presença do material exógeno poderia ter, de fato, provocado uma resposta imunoinflamatória um pouco mais elevada, sem, contudo, ter magnitude suficiente para retardar os fenômenos de osteodeposição.

Na série hematológica vermelha, apenas os parâmetros contagem de hemáceas e volume corpuscular médio estavam alterados, apresentando-se abaixo do limite de normalidade e sugerindo anemia ferropriva. Considerando que hemorragias sofridas durante cirurgias figuram entre as causas de anemia ferropriva (GRANT *et al.*, 2003), seria lícito sugerir que essas alterações hematológicas fossem resultado dos procedimentos cirúrgicos efetuados nos animais.

Todos os parâmetros hematológicos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; no entanto, a despeito de esse achado despertar interesse, o

significado clínico é deveras obscuro, haja vista que eles se encontravam dentro da faixa de normalidade.

Um ponto de extrema relevância neste trabalho foi à análise radiográfica dos espécimes, em que ambos os grupos apresentaram uma barreira mineralizada e que o grupo OTL exibiu defeitos ósseos mais radiopacos que o grupo CTR. A interpretação destes achados constitui um exercício bastante delicado e parcimonioso. Por um lado, eles poderiam estar relacionados com uma maior mineralização do tecido ósseo neoformado, uma vez que os otólitos disponibilizam uma fonte local de minerais via carbonato de cálcio. Contudo, não pode deixar de ser considerado que, conquanto este material seja radiopaco, a sua simples presença na loja óssea determinaria maior radiopacidade no defeito em reparação. Um dado que pode ser explicado pelo fato de que na sua composição os otólitos são ricos em carbonato de cálcio e que os seus constituintes químicos protéicos possam representar o elemento chave para a dinâmica das características dessas estruturas anatômicas e fisiológicas.

A análise global dos resultados do presente estudo indica que, de forma geral, o uso de otólitos parece exercer pouca influência sobre o processo de neoformação óssea. Contudo, foi observada a tendência a melhores resultados no grupo tratado com este biomineral que no controle quanto à quantidade de matriz óssea depositada. Além disso, os dados radiográficos obtidos nesse estudo parecem indicar que se os otólitos apresentam pouca atividade osteoindutora/condutora, estes poderiam atuar na mineralização da matriz óssea neoformada. Assim, sendo, estudos posteriores com outros modelos animais e maior escala de tempo são necessários para averiguar o real papel desse produto natural sobre a dinâmica da reparação óssea.

REFERÊNCIAS

- BASTOS, C. C. G.. **Morfologia de otólitos de algumas espécies de pisciformes (Teleostei) da costa sudeste-sul do Brasil.** São Paulo 1990
- CAMPANA, S. E.; NEILSON, J. D.. **Microstructure of fish otoliths.** Can, J, Fish, Aquat, Sci., 42(5):1014-1032, 1984
- DAY, S. M.; OSTRUM, R. F.; CHAO, E. Y. S.; RUBIN, C. T.; ATO, H. T.; EINHORN, T. A.. **“Bone injury, regeneration, and repair”.** In Buckwalter J.A., Einhorn T.A., Simon S.R.: Orthopaedic basic science. Chicago, AAOS, p.p. 371-399, 2000.
- ELLIS III, E.; SINN, D. P.. **Use of homologous bone in maxillofacial surgery.** I, Oral Maxilloface Surg 1993; 51 (11): 1181-93
- FIGUEIREDO, A. S.. **Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita porosa de coral, poliuretano de mamona e enxerto ósseo autógeno, em coelhos.** [Tese-Doutorado], Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina;2001
- FINKMEIR, C. G.. **Bone - grafting and bone-graft substitutes.** J Bone Joint Surg 2002; 84 (3): 454-65
- GARCIA, I. R.. **Avaliação experimental de três diferentes tipos de implantes:** polímero de mamona, polietileno poroso de alta densidade e matriz óssea bovina, no preenchimento de defeitos ósseos maxilares: estudo histológico e histométrico em macacos [Tese-Doutorado], Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2000
- GARCIA, L. C.; CARVALHO, P. S. P.; OLIVEIRA, J. A. G. P.. **Ação da radiação laser na reparação de feridas de extrato dental infectadas.** Estudo histológico em dental infectada. Estudo histológico em ratos. Rev. Gaúcha Odont. v. 43, p. 191-4, 1995.
- GRANT, C. C.; WALL, C. R.; WILSON, C.; TAUA, N.. **Risk factors for iron deficiency in a hospitalized urban New Zealand population.** J Pediatric Child Health. 2003 Mar; 39(2): 100-6.
- KALISH, B. P.; SCHUSTER, G. S.; PEACOCK, M. E.; CUENIN, M. F.; SWIEC, G. D.; PITTER, B. J.; BUXTON, T. B.; MCPHERSON, J. C. 3RD.. **Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (Rattus norvegicus) calvarium.** J Oral Implantol. 2008; 34(2):83-9.
- LANCE, E. M.. **Some observations on bone graft technology.** Clin Orthop 1985; 200: 114-24,
- LEONEL, F. C. E.; PORCIÚNCULA, F. H.; SOBRINHO, A. J.; RAMALHO, O. T.; MANGILLI, D. P.; RAPOPORT, A.. **The action of the castor bean polymer during the bone neoformation,**
- LINDHEN, J. *et al.* **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- LOWENSTAM H. A.; WEINER, S.. **Minerals and macromolecules - on biomineralization.** Oxford University Press, New York, 1989.

MURAYAMA, E.; YTAGAGI, Y.; OHIRA, T.; DAVIS, J.; GREENE, Mi; NAGASAWA, H.. **Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1.** Eur J Biochem. 2002 Jan;269(2):688-96

MURAYAMA, E.; YTAGAGI, Y.; NAGASAWA, H.. **Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts** Histochem. 2004; 121(2): 155-166.

STEIN, G. S.; LIAN, J. B.. **Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype.** Endocrin Rev, v. 14, p. 424-42, 1993.

TOHSE, H.; YTAGAGI, Y.; NAGASAWA, H.. **Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths.** FEBS J. 2008 may; 275(10):2512-23.

VIEIRA, J. G. H.. **Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas.** J Bras Patol Med Lab. v. 43, n. 2, p. 75-82, abril 2007

WISHART, J. M.; NEED, A. G.; HOROWITZ, M. *et al.*. **Effect of age on bone density and bone turnover in men.** Clin Endocrinol (Oxf) 1995;42:141-6.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS - A inserção da Pesquisa na Temática Saúde e Ambiente e na Ótica Interdisciplinar:

O programa de mestrado de saúde e ambiente da Universidade Tiradentes visa capacitar profissionais capazes de atuar de forma interdisciplinar de maneira ética, crítica e reflexiva na docência e na pesquisa das relações de saúde e ambiente.

O trabalho com o tema **UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE *Cynoscion acoupa* EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE BIOCAMPATIBILIDADE E REPARO ÓSSEO**, pode ser discutido à luz das premissas norteadoras de duas linhas de pesquisa do Programa: **Enfermidades e Agravos à Saúde de Impacto Regional e Produtos Naturais e Saúde**. Na perspectiva da primeira linha, deve ser considerado que este trabalho permeia o desenvolvimento e a análise de alternativas simples para o aprimoramento e diagnóstico terapêutico de defeitos ósseos, especialmente ao compreender que lesões ósseas de natureza traumática ou não ainda constituem um problema de saúde pública, associada a alto grau de morbidade. Na ótica da segunda linha, a presente pesquisa busca e testa um produto natural totalmente novo para o aprimoramento do reparo ósseo. Ainda precisa ser destacado que, tratando-se os otólitos de um resíduo, sua utilização como biomineral poderia agregar valor ao produto (*Cynoscion acoupa* ou pescada-amarela), particularmente em localidades com indústria pesqueira, descobrindo uma alternativa para sua comercialização, além de contribuir para o meio-ambiente na medida em que minimiza seu descarte.

Além disso, a natureza interdisciplinar desta pesquisa está bem expressa na clara inter-relação entre profissionais de diversas áreas de saber envolvidos na sua execução, dentre eles:

- Cirurgiã Geral: para realização dos procedimentos cirúrgicos nos animais;
- Radiologista: para realização dos exames imaginológicos nos fêmures dos animais;
- Biólogo: para a seleção de peso e tamanho da pescada amarela;
- Biomédico: para realização dos exames laboratoriais;
- Patologista: para análise morfológica das lâminas;

- Enfermeiro: para o acompanhamento e cuidados gerais dos animais em estudo e desenvolvimento da pesquisa.

Igualmente, destacamos que além da relevância da pesquisa para o meio científico esperamos contribuir para a construção do conhecimento interdisciplinar sobre as doenças e agravos e seu impacto regional.

APÉNDICE

Apêndice A - Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Titulo do Projeto: ESTUDO PRELIMINAR DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE OTÓLITOS DE CYNOSCION ACOUPA SOBRE O PROCESSO DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM RATOS

Pesquisador responsável: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Data de versão: 17/12/2006

Cadastro: 171206

Data do Parecer: 10/02/2007

Grupo e Área Temática III Projeto fora da área temática especial

Objetivo do Projeto

Objetivo Geral:

Avaliar a influência de biomíneral otólitos da pescada amarela no processo de neoformação óssea em defeito ósseo artificialmente induzido

Objetivos Específicos:

1. Analisar o efeito da utilização de otólitos de pescada amarela sobre a neoformação óssea;
2. Determinar o efeito da utilização de otólitos de pescada amarela sobre indicadores hematológicos e bioquímicos com a neoformação óssea;
3. Determinar alternativa viável para substituir enxerto ósseo autógeno como coadjuvante da dinâmica em neoformação óssea;
4. Identificar a propriedade biomíneral do otólito de pescada amarela.

Sumário do Projeto

Biomateriais inorgânicos são compostos alternativos ao uso de enxerto ósseo autógeno por serem produzidos com propriedades potencialmente semelhantes ao do tecido receptor e, quando usados em defeitos ósseos longos constituem elementos capazes de promover ou auxiliar a neoformação óssea, por mecanismos de osteoindução e/ou osteocondução. Dentre os biomateriais de comprováveis atividades sobre a neoformação óssea, merece destaque o grupo do biomíneral. Estes representam tecidos duros que consistem basicamente de compostos inorgânicos e, entre suas funções, citam-se a manutenção da estrutura corporal, proteção, estocagem de minerais, entre outras. Tais biomateriais consistem de uma fase predominantemente mineral incorporada a uma matriz orgânica que, de maneira geral, compõe de 0,01 a 10% de seu peso total. A matriz orgânica, por sua vez é representada por uma rede completa de glicoproteínas, proteoglicana e proteínas colagênicas e não colagênicas, e desempenha um papel fundamental nos vários estágios do processo de mineralização do octeóide durante a neoformação do otólito, são construções calcárias do ouvido interno do peixe ósseo e constituem parte de um sistema que atua como sensor de profundidade e equilíbrio, assim como detector de vibrações sonoras. Estudos vêm demonstrando que otólitos são ricos em carbonato de cálcio e uma proteína colagênica de alto peso molecular denominada otolina. Adicionalmente, existem nesta estrutura, além do carbonato de cálcio, elementos metálicos (Sr, BA, MG, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K, etc.). Assim como não metálicos (SI, P, S, B, etc.) Admite-se, pois que otólitos poderiam representar um excelente exemplo de biomíneral, uma vez que apresentam uma porção inorgânica rica em elementos essenciais ao processo de mineralização, fase importante da neoformação óssea, bem como uma porção protéica de otolina que poderia funcionar como matriz orgânica. Dentro desta perspectiva, propomo-nos a estudar o comportamento da regeneração do tecido ósseo perdido, em defeito ósseo artificialmente induzido, preenchidos com um preparado em pó estéril de otólitos, visando avaliar o papel de reconstituente no fenômeno de neoformação óssea. Através dessa pesquisa pretende-se avaliar a influência de biomíneral otólito de pescada amarela, no processo de neoformação óssea em defeito ósseo artificialmente induzido. Objetiva-se, assim, determinar alternativas viáveis e acessíveis para substituir os enxertos ósseos autógenos e como adjuvantes na dinâmica na regeneração óssea, no afã de amenizar riscos e custos para os pacientes. Considera-se ainda, que a pescada amarela habita toda a faixa litorânea do Brasil existindo mais de 30 espécies diferentes deste peixe, estes fatores concorrem para facilitar sobremaneira a aquisição da matéria-prima deste experimento (otólito) o que, indubitavelmente, resultaria em um composto de baixo custo e grande acessibilidade.

Metodológicos Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto financiado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local da realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequada

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
-------------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
------------------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Paciente e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho da amostra	Total: 60 Local: 60
Calculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos	Não
Solução equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios da inclusão e exclusão	Adequados
Relação Custo-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de uso de drogas	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada-quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às normas	Sim

Comentários sobre e Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01
Data de término prevista	03
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Projeto de alta relevância para comunidade científica e população de maneira geral, sendo considerado aprovado no que se refere a seus aspectos éticos.