ESTUDO PRELIMINAR: DESCALCIFICAÇÃO COM FERRÕES DE RAIAS

Emilly Cristiny de Melo Assunção[1], Adna Keila dos Santos[2], Adriano Biancalana[3]
[1] Universidade Federal do Pará, email emilly.assuncao@soure.ufpa.br
[2] Universidade Federal do Pará, email adna.keilla2@gmail.com
[3] Universidade Federal do Pará, email biancalana@ufpa.br
PALAVRAS CHAVE: descalcificação, histologia, raia, veneno

Introdução

O estudo do tecido ósseo ou calcificado, através da técnica de rotina histológica requer uma etapa de descalcificação após a fixação, de modo a que o cálcio inorgânico seja removido da matriz orgânica de colágeno e, consequentemente, se possam obter cortes destes tecidos [1, 2].

Alguns estudos apoiam o fato de que a utilização de MegaWatt acelera o processo de descalcificação, sem que haja comprometimento da estrutura tecidual. Além do mais a utilização deste método não diminui a antigenicidade do tecido [1], porque as MW não são fortes o suficiente para alterar ligações covalentes ou para quebrar as pontes de hidrogénio, permanecendo a arquitetura celular intacta [3, 4].

As raias são animais da classe dos Chondrychthyes, que constituem um grupo predominantemente marinho, esse nome se dá pelo seu esqueleto cartilaginoso. Na ordem dos Myliobatiformes estão as arraias chamadas de arraias-de-ferrão, onde predominam umas das características mais importantes, calda com presença de um ou mais ferrões retrosserilhados na porção dorsal [5]. A estrutura do ferrão é composta por uma região óssea localizada no centro do ferrão. No epitélio estão presentes as células secretoras de veneno, que costumam se localizar próximas às serras laterais, essas células possuem vesículas fusiformes em seu citoplasma e são compostas por material proteico. Para chegar a esta conclusão o material foi submetido ao processo de descalcificação em EDTA 5% por cerca de 4 anos, para alcançar cortes com boa resolução [6].

Os processos de descalcificação convencionais são morosos, podendo levar dias a meses [3]. Este intervalo de tempo pode ser decisivo, no que diz respeito à morfologia do tecido e à sua antigenicidade, e pode também ser o suficiente para atrasar um relatório clínico [1].

Portanto o presente estudo objetiva diminuir o tempo de descalcificação de tecido ósseo para facilitar análises celulares e histológicas, especificamente com ferrões de raia que apresenta maior resistência para descalcificar.

Materiais e Métodos

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151692?lang=pt-br

Os ferrões coletados foram das espécies: *Potamotrygon scobina, Potamotrygon orbignyi, Plesiotrygon iwamae* pertencentes a família Potamotrigonidae, no município de Soure (S00°44'32,4"; W048°30'24,9") PA. (Sob licença fornecida pelo sistema sisbio/icmbio n° 60966-1) por meio de uma armadilha fixa chamada "Curral" [6]. Após coletar as amostras foram fixadas em solução contendo formol 10% e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Pará. Depois de 24h no fixador, o material foi submetido ao processo de descalcificação em 4 soluções que estão distribuídas na tabela a seguir:

Tabela 1: relação de soluções utilizadas para descalcificação

Solução	Formaldeído	Concentração EDTA (%)	Água Destilada	pH
1	100ml	5,5	900ml	7,02
2	100ml	8,1	900ml	8,05
3	100ml	5,5	900ml	4,85
4	100ml	9,2	900ml	7,02

Os ferrões, posteriormente coletados e cortados em pedaços de 4mm, foram submetidos às soluções citadas na tabela 1. As amostras ficaram em solução durante 1 mês, havendo mudança de 2 em 2 dias, com a mesma concentração. Além disso, o ferrão 8, como mostra a tabela 2, foi exposto uma vez ao mês a aumento de temperatura com dois ciclos, na utilização de um micro-ondas eletrodoméstico. O ciclo 1 consiste em potência 10W com duração de 20 segundos e o ciclo 2 em potência 90W com duração de 5 segundos.

Resultados e Discussão

Os ferrões apresentaram resultados variáveis de acordo com as diferentes concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e pH. Ao comparar a tabela 2, os ferrões em soluções de pH 7,02, além de apresentarem menos rigidez, houve mais preservação do epitélio do que os demais que estão em pH <7 e pH >7. Diante disso, as amostras que estão em solução com maior concentração de EDTA perderam rigidez e mantiveram o tecido preservado. Ademais, o aumento da temperatura por meio do micro-ondas não evidenciou diferença ao relacionar com o restante das soluções.

Logo, as soluções que demonstram mais eficiência de descalcificação com preservação do epitélio foram SL1 e SL4, para tentativas para corte histológico, em comparação aos outros materiais presentes no Laboratório de Biologia Celular e Molecular

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151692?lang=pt-br

da UFPA, como carapaça de crustáceos, expostas nestas soluções descalcificaram com mais facilidade.

Por isso, se utilizou experimentos com diferentes concentrações e submetidos a novas condições de temperatura e pH, a fim de obter resultados satisfatórios. Esses protocolos possuem o objetivo de permitir a realização de cortes histológicos com preservação de epitélio. Possibilitando a caracterização e estudo de suas células de veneno. Análise que o material calcificado não permite.

Tabela 2: relação de ferrões e resultados nas soluções

Amostras de Ferrões	SL1	SL2	SL3	SL4
1	Fragmentou	SE	PE	
2	PE	PE	PE	
3	P	PE	PE	
4	PE	SE	SE	
5	P	P	PE	P
6	P	Fragmentou	P	P
7	PE	PE	SE	
8	PE	PE	PE	

Legenda: Solução (SL), pouco Epitélio (PE), preservado (P), sem epitélio (SP)

Conclusões

Conclui-se que para realizar corte histológico eficiente em menos tempo, após descalcificação de ferrões de raia, é necessário o aumento da concentração de EDTA. Além disso, testes com aumento da temperatura não influenciaram nos resultados. Vale ressaltar que na literatura não consta informações suficientes para maior discussão e conclusões deste trabalho.

Agradecimentos

Universidade Federal do Pará (UFPA), PIBIC e CNPQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Gruntz S L, English V, **Expedited bone throughput using microwave decalcification. In Experimental Pathology Laboratories.** Disponível em: http://www.sakura-americas.com/histologic/pdf. 11 Jun. Acesso em: 25 de maio 2022.

[2] Lorreille O, Diegoli T.M, Irwin J, Coble M., Parsons T. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. **Forensic Science International: Genetics I**. p191-195, 2007.

[3] Pitol D M, Caetano F.H, Lunardi, L.O. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. **Braz. Dent. J**. vol.18 no.2. 2007.

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151692?lang=pt-br

[4] Weisberger E. C., Hilburn M., Johnson B., Nguyen C. Intraoperative Microwave Processing of Bone Margins During Resection of Head and Neck Cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**; 127. 2001

[5] ROSA, Ricardo de Souza. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Unpublished Ph. D. Dissertation. **The College of William and Mary**, Williamsburg, Virginia, pp. 523, 1985.

[6] SANTOS, Keila *et al.* Análise histológica dos ferrões de raias no município de Soure/Ilha do Marajó – Pará. Revista Científica multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 05, Ed. 10, Vol. 08, pp. 141-157. Outubro de 2020.

ISBN: 978-65-89463-25-2
https://proceedings.science/p/151692?lang=pt-br