

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Instituto de Física

**Identificação e propriedades da hidroxiapatita  
do protozoário *Spirostomum ambiguum*,  
estudadas por métodos óptico-eletrônicos**

SBI-IFUSP



305M810T3342

**Regina Reiko Takagui**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Silveira**

---

*Dissertação apresentada ao Instituto de Física  
da Universidade de São Paulo para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências*

---

*Defesa 14/04*

**São Paulo**

**2000**



502.82  
T136i  
M  
ex. 1

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação  
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Takagui, Regina Reiko

Identificação e Propriedades da Hidroxiapatita do  
Protozoário *Spirostomum ambiguum*, estudadas por  
Métodos Óptico-Eletrônicos. São Paulo, 2000.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.  
Instituto de Física - Departamento de Física Geral

Orientador: Profa. Dra. Marina Amélia P. V. S. Santos  
Área de Concentração: Biofísica

Unitermos: 1. *Spirostomum ambiguum*;  
2. Calcificação; 3. Biomineralização; 4. Hidroxiapatita;  
5. Protozoário Ciliado.

USP/IF/SBI-005/2000

BANCA EXAMINADORA:

*Marina A. P.V. Spueira Santos*

---

Profa. Dra. Marina Amélia Pinto Viégas da Silveira Santos (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Teresa Lamy-Freund (IFUSP)

Profa. Dra. Regina Vugman Milder (ICBUSP)

*Arlete Ferraz*  
Prof. Arlete Ferraz  
Presidente da Comissão de Pós Graduação

À minha família e todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.



## Agradecimentos

Agradeço profundamente à Profa. Dra. Marina Silveira pelas aulas, orientação e discussões.

Profs. Drs. Pedro K. Kiyohara, Helena S. Santos e Teresa W. Campos pelo uso do laboratório e apoio.

Hannes Fischer pela profunda amizade, discussão e apoio.

Profa. Dra. Cecil Chow Robilotta pelo grande apoio dado.

Simone P. Toledo e Silvio L. Ferrari pelo auxílio nos experimentos.

Giovanni Fois e Roberto Morato Fernandez pela amizade e apoio.

Profs. Drs. Armando Paduan Filho, Walter Maigon Pontuschka, Amando Siuiti Ito, Emi Marcia Takagui, Sunao Sato, João C.M. de Carvalho pelo apoio.

Celso Vieira de Moraes e Nildemar A. Messias Ferreira (IPEN/CNEN-SP) e Isaac J. Sayeg (IG-USP) pelo uso dos equipamentos.

Dr. Fernando Kauas pelas discussões e fornecimento do esmalte de dente.

Carlos Roberto Marques e Carlos Eduardo Franco de Siqueira pelo auxílio nos desenhos.

Paulo A. Bergo, João Tertuliano Nepomuceno Agra, Mario Sandro F. da Rocha, Maria de Fátima A. de Souza, José Soares de Lima Filho, Claudio H. Furukawa, Fábio de Oliveira Jorge, Danusa Duarte, Nadia Gomes, Diogo Soga, Evaldo A. de Oliveira Filho, Félix C da Silva, José M. Prison, Luzia Saeko Kanashiro, Marcos V. Travaglia, Maria Inês Ribas Rodrigues, Raquel Abisa, Roberto C. Bianchini, Roberto H. Lopes, Doris Maribel Escriba Villanueva, Rosemeire Gloria Nogueira e Yeung Luk Chong pela amizade e apoio.

Ao CNPq (Proc.: 134729/97-8) pelo apoio financeiro.

# Índice

<i>Abstract</i>	7
<i>Resumo</i>	8
<i>Trabalhos publicados</i>	9
<b>I. Introdução</b>	10
<i>Spirostomum ambiguum</i>	10
Hidroxiapatita	13
Objetivos do trabalho	15
<b>II. Materiais e métodos</b>	16
Método de isolamento e coleta dos organismos	16
Sub-cultura em laboratório	18
Experimento com estímulo elétrico <i>in vivo</i>	19
Isolamento e estudo dos ossículos inteiros	20
Organismos inteiros	22
Cortes ultra-finos	23
Experimento citoquímico	23
<b>III. Resultados</b>	25
<b>IV. Discussão</b>	49
<b>V. Conclusões</b>	54
<b>VI. Referências</b>	55

## Abstract

The ciliate protozoan *Spirostomum ambiguum* is known to contain deposits of hydroxyapatite as first detected by F.G.E. Pautard in 1959 (Biochim. Biophys. Acta **35**: 33, 1959). A piezoelectric potential was applied to laboratory cultured organisms in order to stimulate growth of these deposits, and to follow this mineralization process. Here we report studies on the isolated aggregates (ossicles) as obtained by use of transmission and scanning electron microscopy, combined with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), selected area electron diffraction (SAED) and other methods. Organisms kept starving for almost 3 months underwent a progressive change in body shape, from elongate to a "ball" shape; at this late stage of volume change, the cells were loaded with mineral inclusions. The synthesis of the ossicles is very likely associated to the alkaline phosphatase activity, as demonstrated in thin sectioned material, using the Mayahara's incubating medium (Mayahara, H., et al. Histochemie **11**: 88, 1967). Results obtained in the present study, confirmed the hydroxyapatite nature of these ossicles. Within the ossicles, the constituent crystals exhibit a radial disposition as seen in thin sections. A computer processed model is proposed for the hydroxyapatite crystal of *Spirostomum ambiguum*.

## Resumo

O protozoário ciliado *Spirostomum ambiguum* contém depósitos de hidroxiapatita, e foi estudado por F.G.E. Pautard em 1959 (Biochim. Biophys. Acta **35**: 33, 1959). No presente trabalho um potencial piezoelétrico foi aplicado em organismos cultivados em laboratório a fim de estimular o crescimento destes depósitos e analisar o processo de mineralização. Estudou-se os agregados isolados (ossículos) através da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, combinadas com microanálise de raios-X, difração eletrônica de área selecionada (DEAS) e outros métodos. Foram analisados dois tipos de amostras, provenientes de células normais e em jejum. Naquelas mantidas em jejum por aproximadamente 3 meses, observou-se uma mudança progressiva na forma do organismo de "alongado" para forma de "esfera". Neste estágio final, as células apresentavam-se carregadas de inclusões minerais. A síntese destes ossículos parece estar associada com a atividade da fosfatase alcalina, conforme demonstrado nos cortes ultra-finos utilizando o meio de incubação de Mayahara (Mayahara, H., et al. Histochemie **11**: 88, 1967). Resultados obtidos no presente estudo, utilizando as técnicas acima mencionadas, confirmaram a natureza da hidroxiapatita destes ossículos. A aplicação do campo elétrico mostrou que ocorre uma mudança na forma dos cristalitos de agulha para placa. Ainda não foi possível identificar o sítio inicial da síntese destes cristais. Os ossículos já formados mostram nos cortes ultra-finos, um arranjo radial dos cristalitos, distribuídos em anéis concêntricos.

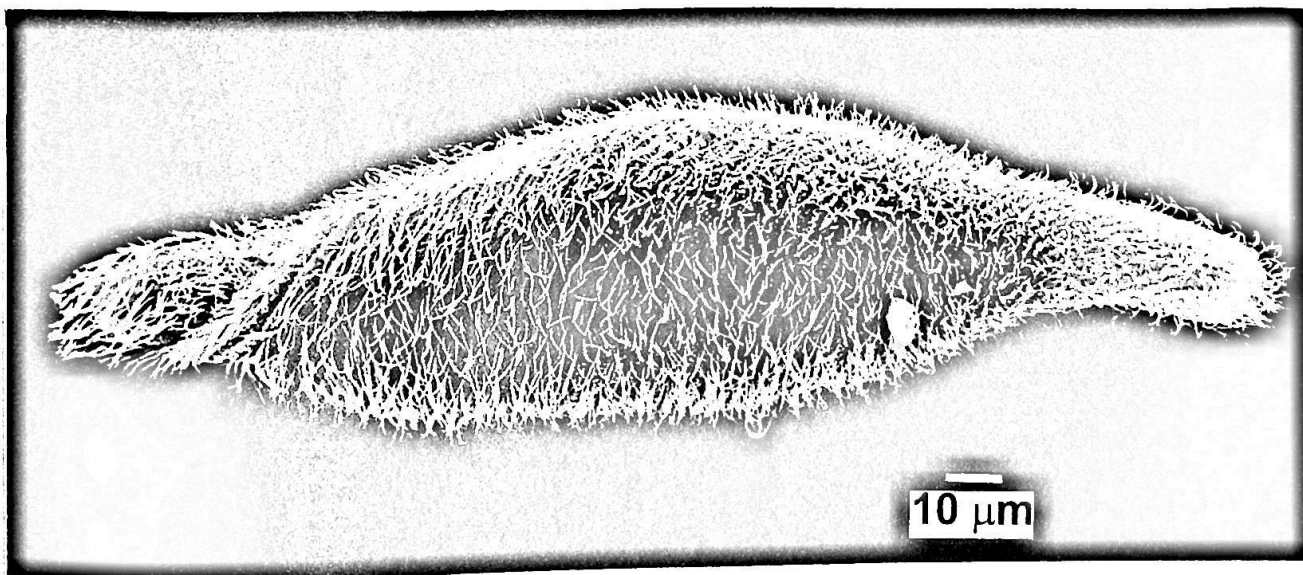
## Trabalhos publicados

- "Studies of the Ossicles from the Ciliate Protozoan *Spirostomum ambiguum*"  
Regina Reiko Takagui and Marina Silveira.  
Japanese Journal of Applied Physics, 1999, Vol 38, No 9A, Part 1, 5303-5304.
  
- "Alkaline Phosphatase Activity and the Ossicles of the Unicellular Organism *Spirostomum ambiguum*" (manuscrito a ser submetido).  
Regina Reiko Takagui and Marina Silveira.

## I. Introdução

### *Spirostomum ambiguum*

Na escala evolutiva dos seres vivos, protozoários constituem os primeiros organismos unicelulares eucarióticos, isto é, organismos que desenvolveram núcleo e citoplasma separados por uma membrana. *Spirostomum ambiguum*, nosso material de interesse, é um protozoário do filo Ciliophora que utiliza para sua locomoção cílios regularmente distribuídos em fileiras helicoidais (Barnes, 1984; Sleigh, 1973). A célula de forma alongada, medindo até 3 mm de comprimento, é altamente contrátil. Na extremidade anterior, localiza-se uma dobra oblíqua ciliada (membranela) circundando a fenda bucal ou peristômio, que atinge aproximadamente 2/3 do comprimento do corpo; na extremidade posterior localiza-se um grande vacúolo pulsátil (figura 1). *Spirostomum* alimenta-se de bactérias e fungos (Bick, 1972), sendo mantido facilmente no laboratório.



**Figura 1:** *Spirostomum ambiguum* visto por microscopia eletrônica de varredura. Extremidade anterior à esquerda.

Finley (1951) estudou a estrutura interna deste organismo utilizando a microscopia eletrônica; porém Pautard (1959) foi quem primeiramente detectou depósitos cristalinos em *Spirostomum ambiguum*, e os identificou por difração de raios-X como sendo hidroxiapatita. Ele cultivou os organismos em um meio padrão de terra, água de torneira e grãos de trigo; isolou os agregados cristalinos a partir de células trituradas em gelo e obteve por centrifugação, partículas densas e redondas de até 3 $\mu$ m de diâmetro, que chamou de "ossicles" (ossículos). Pautard notou ainda que ossículos isolados de células jovens exibiam projeções em forma de agulhas na periferia, enquanto que aqueles isolados de células idosas apresentavam-se na forma de plaquetas. Estes agregados cristalinos vistos com maior aumento, apareciam em secções como bastonetes discretos, de aproximadamente 215 X 65 Å (cristais de hidroxiapatita), parecendo-se com estruturas similares existentes na dentina humana (Pautard, 1959). Os ossículos ocorriam espalhados por todo o citoplasma, em grupos bem delimitados. Foi verificado por microscopia eletrônica que animais mantidos em cultura por 5 meses, possuíam ossículos na forma de filamentos, como também agregados em forma de placa (predominância de dimensões grandes), estando sempre confinados em vesículas.

Mais recentemente, Osborn e Hamilton (1977), realizaram no mesmo *Spirostomum*, experimentos de mapeamento de raios-X usando microsonda eletrônica; verificaram uma grande concentração de ions de Ca localizada principalmente na região anterior da célula, mas decrescendo em direção à extremidade posterior; a distribuição de K e P também apresentou um gradiente antero-posterior, enquanto Mg ocorria sem nenhuma distribuição preferencial.

Osborn e Hamilton (1977) não puderam precisar a origem do cálcio, mas sugerem que esteja envolvido na contração da célula.

Depósitos de cálcio na forma de carbonato (calcita, aragonita) são comuns em outros protozoários (Bien e Preston, 1968) como também em conchas, carapaças e ossículos de diversos animais (Mann et al., 1981) porém na forma de fosfato (apatita) só foi relatada até o momento no *Spirostomum ambiguum* (Pautard, 1959; 1960).

*Spirostomum ambiguum* contrai diante de estímulos mecânicos, elétricos e químicos com um tempo dez vezes mais rápido que o músculo estriado de vertebrado (Hamilton e Osborn, 1976).

O sistema contrátil é capaz de encurtar o animal para menos que 50% de seu comprimento em aproximadamente 5 ms e envolve uma profusão de fibrilas (proteínas



fibrosas), microtúbulos e mionemas, (Hamilton et al., 1974); esta contração provavelmente estaria associada à presença do cálcio.

Resultados de Ohara e Shigenaka (1985); Hawkes e Holberton, 1974; Ishida et al., 1992; Ishida et al., 1996; Jones, 1966 e Lehman e Rebhun, 1971, mostraram que o mionema parece estar relacionado não à assim denominada "contração de torção" mas ao encurtamento do corpo celular ao longo do eixo longitudinal.

Há estudos que indicam que a contração dos mionemas é resultante de um aumento da disponibilidade de cálcio, e sua relaxação um decréscimo do mesmo (Jones, 1966).

A contração em *Spirostomum ambiguum* seria então controlada por um sistema vesicular interno, análogo ao retículo sarcoplásmico do músculo estriado, o qual regula os níveis de cálcio que se encontram no citoplasma. Sob condições iônicas adequadas a rede vesicular despolariza e libera cálcio, dando início à geração de tensão através do maquinário contrátil da célula (Clark, 1945; Ettienne e Selitsky, 1974).

Experimentos utilizando proteínas bioluminescentes, que emitem luz na presença de íons cálcio, mostraram que estes íons armazenados em vesículas são liberados sob estímulo elétrico. Aparentemente o cálcio teria a mesma função no controle da contratilidade do *Spirostomum ambiguum* como no músculo estriado (Ettienne, 1970).

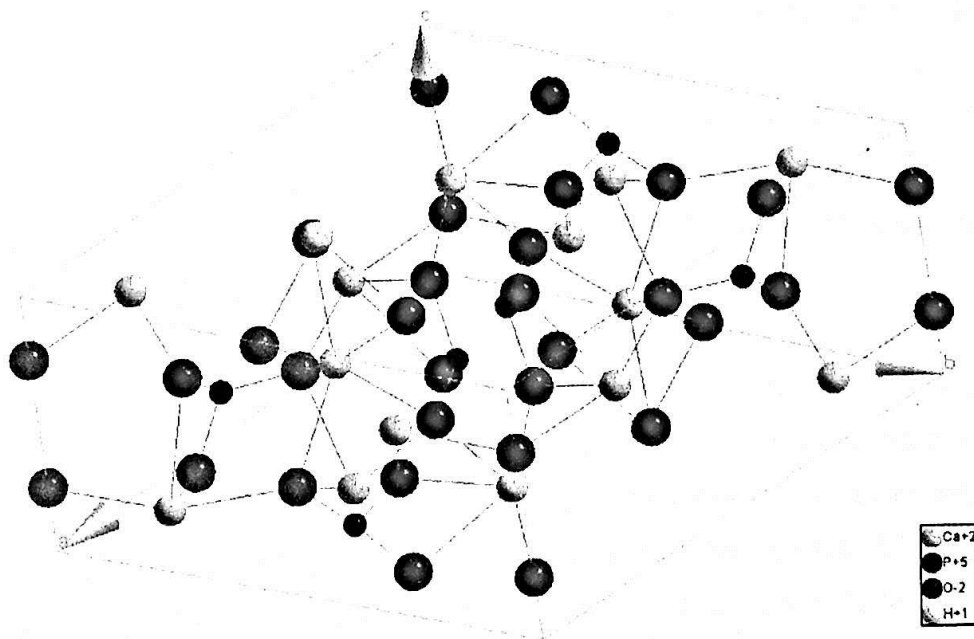
A direção do batimento ciliar é outro fenômeno regulado por eventos bioelétricos dependentes de  $Ca^{2+}$  na membrana. Estes eventos nas membranas das células dos protozoários controlam a frequência de batimento e orientação espacial do movimento dos cílios e flagelos. *Spirostomum ambiguum* executa um movimento espontâneo de natação "ambígua", revertendo esporadicamente o sentido do seu deslocamento. Isto implica em uma reversão da direção do batimento dos cílios que revestem a célula. A reversão ciliar é explicada como resultado de uma redução na concentração de íons cálcio bivalentes em relação aos cátions monovalentes do organismo. Presume-se portanto, que sais de cálcio solúveis sejam prontamente disponíveis para estas atividades da célula.

É bem conhecido que hidroxiapatita é o principal componente mineral do esqueleto ósseo e do esmalte dentário de vertebrados. A presença e o significado de hidroxiapatita na forma de depósitos intracelulares no protozoário, constitui um fato inusitado e ainda não esclarecido. Por outro lado, a disponibilidade do organismo na natureza e sua facilidade de cultivo no laboratório, além das dimensões convenientes, tornam o material muito atraente como um modelo simples para estudo de biomineralização.



## Hidroxiapatita

Os sais cristalinos de hidroxiapatita cuja fórmula é  $\text{Ca}^{++}_{10-x}(\text{H}_3\text{O}^+)_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , são os principais constituintes de ossos e dentes de vertebrados. Os cristais tem estrutura hexagonal, sendo os parâmetros de rede da célula unitária:  $a = 9,400(30)$  Å;  $b = 9,400(30)$  Å;  $c = 6,930(30)$  Å; onde  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$ , pertencentes ao grupo espacial P 63/m (176 - hexagonal) (Hendricks et al., 1932), como mostra a figura 2. Os cristais ocorrem como placas longas e achatadas, tendo cerca de 400 Å (40nm) de comprimento, 10 a 30 Å (1 a 3 nm) de espessura e 100 Å (10nm) de largura. A razão Ca/P varia entre 1,3 – 2,0 dependendo das condições químicas e físicas (Weast, 1974; Guyton, 1977). Quantidades menores e variáveis de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^+$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{Mg}^{++}$  são também encontrados nos sais ósseos (Best, 1959).



**Figura 2:** Ilustração da célula unitária de hidroxiapatita definida pelos vetores a, b, c mostrando a ligação entre os átomos. Parâmetros da célula unitária são  $a = 9,400$  Å,  $b = 9,400$  Å,  $c = 6,930$  Å;  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$ . Figura criada utilizando o programa Diamond 2.0.

O osso é constituído por uma rígida matriz orgânica que, em média constitui cerca de 30% do peso, os restantes 70% são sais de hidroxiapatita. Entretanto o osso recém formado pode possuir uma percentagem bem mais alta de matriz em relação aos sais.

Nos ossos de vertebrados, a precipitação de hidroxiapatita se processa sobre uma matriz de fibras colágenas. Os precipitados aparecem em intervalos periódicos ao longo de cada fibra colágena, formando pequeninas aglomerações que crescem gradualmente em um período que vai de dias a semanas, formando o produto final, os cristais de hidroxiapatita.

Os primeiros sais de cálcio a serem depositados não são cristais de hidroxiapatita, mas sim, compostos amorfos (não cristalinos) provavelmente de  $\text{CaHPO}_4$  ou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Então, por um processo de substituição e adição de átomos estes sais são transformados nos cristais de hidroxiapatita. Ainda não se sabe qual o mecanismo da deposição de sais de cálcio no osteóide (Guyton, 1977).

É importante entender que a precipitação biológica ocorre muito próximo ao equilíbrio e pode ser facilmente revertida em todos os casos. A forma que se desenvolve pode depender de tensões internas, podendo variar com o tempo (Pautard e Williams, 1982).

Testes de autoradiografia e histoquímica localizaram os depósitos de fosfato de cálcio no endoplasma do *Spirostomum* (Jones, 1967). Já o ectoplasma e o material nuclear não apresentaram estes depósitos. Jones sugeriu que eles possam se originar de excreções derivadas a partir de acumulações em mitocôndrias.

Em muitas investigações sobre a mineralização do osso faz-se o uso do efeito piezoelétrico, o qual relaciona tensão mecânica e potencial elétrico em sólidos. É conhecido para sistemas biológicos, que a aplicação de um campo elétrico induz, por exemplo, um aumento na concentração intracelular de íons livres de cálcio. Assim, o uso apropriado de um potencial elétrico pode acelerar a cura de fraturas. O fato de ossos se desenvolverem em regiões de tensão e se dissolverem onde não há tensão, já é bem conhecido. Observa-se por imagens de raios-X em fraturas tratadas que, após alguns meses, um crescimento volumoso que circunda o local da fratura quando esta é imobilizada, reajustará para a forma original do osso. Também foi observado que um paciente durante repouso na cama pode perder até 0,5g de cálcio por dia e, nos primeiros vôos espaciais em condições de gravidade nula os astronautas perderam até 3g de cálcio por dia. Percebe-se que há um mecanismo que controla este crescimento e dissolução e muitos estudos tem sido feitos a fim de esclarecer este fenômeno (Damask, 1978).

Piezoelasticidade é a geração de eletricidade causada por pressão, e foi descoberta em 1880 por Pierre e Jacques Curie. A piezoelasticidade é uma interação entre sistemas elétricos e mecânicos. Assim, quando uma amostra é submetida a um "stress" mecânico ocorre uma polarização das cargas. O efeito inverso também ocorre, isto é, quando se aplica um campo elétrico num cristal este acaba se deformando. Ambos efeitos (efeito piezoelétrico direto ou inverso) são manifestações da mesma propriedade fundamental do cristal (Ikeda, 1996). A piezoelasticidade no osso foi primeiramente descrita por Fukada e Yusada em 1957 (em Damask, 1978).

A descoberta de que campos elétricos causam crescimentos e dissoluções do osso fez com que pequenos eletrodos e uma bateria fossem implantados em seres vivos. Percebeu-se que esta técnica acelerava a cura e dissolução da fratura de ossos cancerígenos. Contudo havia considerável controvérsia quanto à sua verdadeira eficácia, e pelo fato de ser uma técnica invasiva fez com que não fosse bem aceita pela comunidade científica. Hoje em dia cientistas das mais diversas áreas (médicos, biólogos, veterinários, etc...) estão empenhados em estudar como fazer diagnósticos e tratamentos que não utilizem técnicas invasivas (Damask, 1978).

Sugeriu-se que campos piezoelétricos originados por forças devido ao movimento normal do corpo, atuam sobre íons do fluido nutriente, alimentando assim mais facilmente o osso (Salgueiro e Ferreira, 1991).

Em protozoários, depósitos internos de fosfato de cálcio são desconhecidos, exceto no *Spirostomum* (Jones, 1967).

No presente estudo, procurou-se então investigar a ação de um campo elétrico externo, sobre os ossículos do *Spirostomum*, *in vivo*. Construiu-se para isso um circuito especial.

### **Objetivos do trabalho**

- ✓ Desenvolver uma metodologia para cultivar o protozoário no laboratório, em quantidade suficiente para os vários ensaios.
  - ✓ Isolar, identificar e caracterizar os ossículos do protozoário *Spirostomum ambiguum*, utilizando diferentes métodos de microscopia eletrônica, microanálise e citoquímica.
  - ✓ Investigação de processo físico que estimulasse a formação dos ossículos, visando também entender o processo de síntese, crescimento e maturação dos ossículos *in vivo*.
-

## II. Materiais e métodos

O material utilizado foi o protozoário ciliado *Spirostomum ambiguum* (Protozoa, Ciliata, Spirotrichia, Heterotrichida), coletado originalmente de plantas aquáticas do Departamento de Botânica da USP (principalmente Elodea e Cabomba). Algumas amostras foram obtidas também de plantas adquiridas de lojas de aquário. Após algumas semanas obteve-se grande quantidade de protozoários na cultura, sendo possível reconhecer a população de *Spirostomum* com um microscópio binocular.

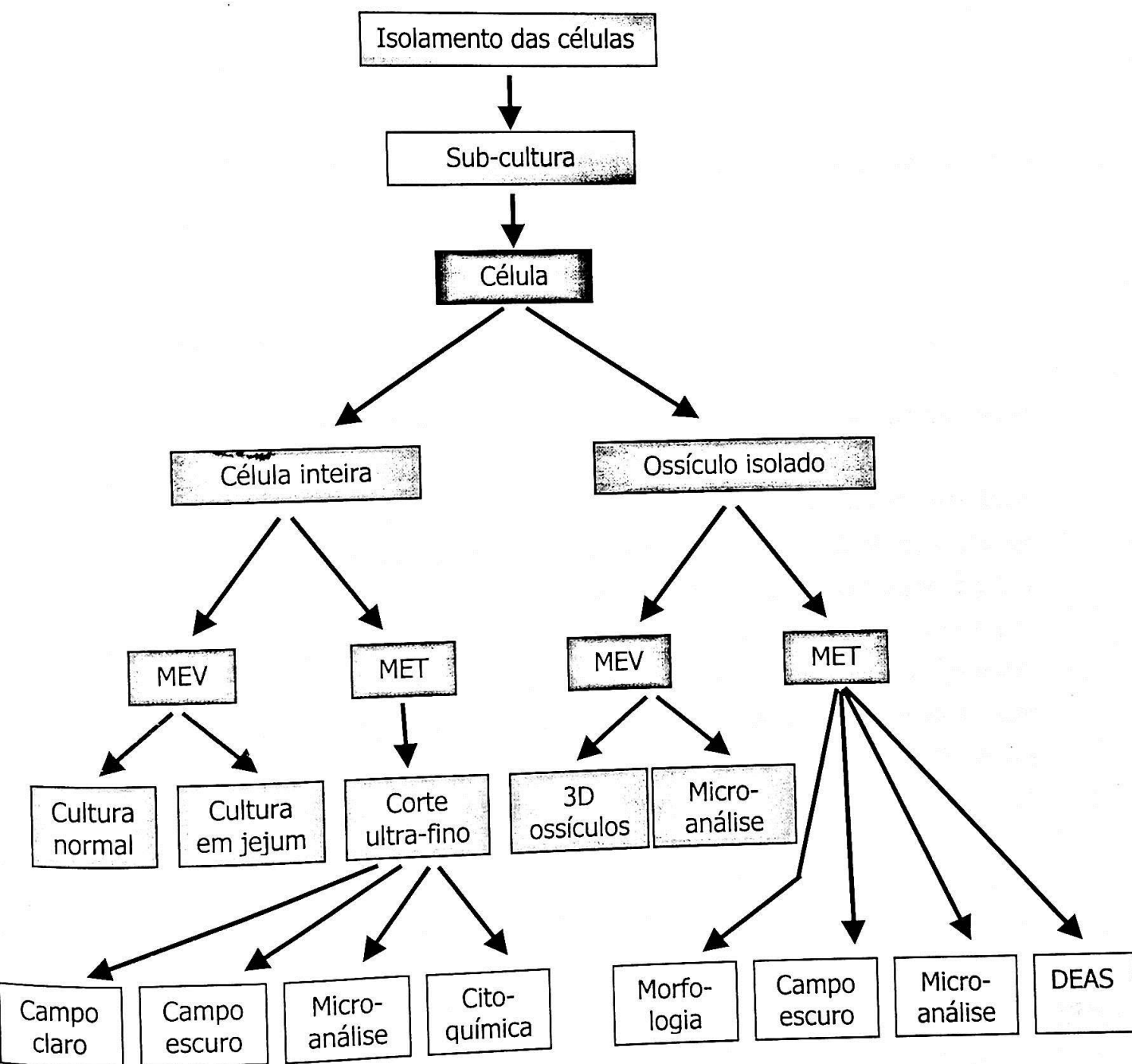
### Método de isolamento e coleta dos organismos

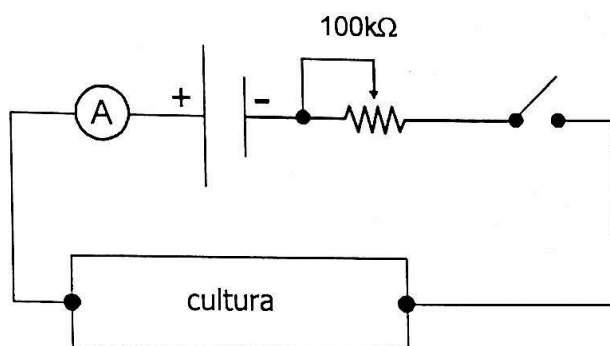
Filtrou-se a água contendo os microorganismos com peneiras hiperfinas de nylon (redes usadas para plâncton). Numa placa de Petri, colocou-se metade da quantidade dessa água contendo *Spirostomum* e a outra metade preencheu-se com água mineral.

Para isolar *Spirostomum ambiguum* dos outros organismos, construímos um circuito elétrico que foi adaptado à placa de Petri. Este circuito (figura 3) constava de: bateria de 9 V, potenciômetro, multímetro, 2 eletrodos de aço inox e "switch" (chave). Os eletrodos de aço inox foram fixados como ilustrado na figura do circuito; ligou-se a bateria, ajustando-se o potenciômetro de tal modo que uma corrente de aproximadamente  $500\mu\text{A}$  passasse pelas células. Para coletar o material utilizou-se micropipetas confeccionadas no Laboratório Didático do Instituto de Física da USP manipuladas sob um microscópio estereoscópico (Takagui e Silveira, 1999).

Este circuito foi montado a fim de isolar *Spirostomum ambiguum* dos demais protozoários que possuem galvanotaxia bem definida e migram rapidamente para o catodo. *Spirostomum* apresenta um comportamento diferente; tem galvanotaxia transversa, isto é, ele se alinha transversalmente ao campo elétrico de acordo com Sleigh, (1973; 1974).

O quadro adiante sumariza a metodologia empregada neste estudo.





**Figura 3:** Diagrama ilustrando o circuito utilizado para a coleta de *Spirostomum ambiguum*.

### Sub-cultura em laboratório

O seguinte procedimento foi utilizado para o sub-cultivo de *Spirostomum ambiguum*:

Lavou-se areia em água corrente várias vezes e as últimas lavagens em água destilada; esterilizou-se em estufa por aproximadamente 3 horas à temperatura de  $\sim 140$  °C; após o esfriamento da mesma à temperatura ambiente, colocou-se 2 grãos de arroz integral (préviamente fervidos por aproximadamente 3 minutos) para suprir as bactérias que se alimentam de amido em placas de Petri de plástico ou de vidro. Despejou-se a seguir, 38 ml de água mineral e colocou-se areia suficiente para cobrir os grãos (figura 4). No dia seguinte, inoculou-se aproximadamente 300 células utilizando-se o procedimento de isolamento do item anterior.





**Figura 4:** Recipiente para o cultivo de *Spirostomum ambiguum* contendo água mineral, grãos de arroz integral e areia tingida de verde (Tamanho natural).

Semanalmente renovou-se os grãos de arroz acrescentando-se água mineral quando necessário, no caso de evaporação.

O comportamento *in vivo* dos animais foi seguido diariamente (manhã, tarde e noite) verificando-se as condições de sobrevivência e crescimento dos mesmos.

Para outros experimentos deixamos sub-culturas em jejum por aproximadamente 3 meses, apenas completando o volume de água perdido por evaporação.

### **Experimento com estímulo elétrico *in vivo***

A fim de estudar a influência do campo elétrico nos ossículos do organismo, construímos um circuito estável (figura 5).

Nesta experiência usamos *Spirostomum* com 2 meses de cultivo, sob condições normais de alimentação. Aplicamos uma corrente de 80  $\mu\text{A}$  em forma de pulsos, durante 2 segundos, com intervalos de 1 minuto, durante uma semana. Os organismos foram mantidos na própria sub-cultura numa vasilha

representada no diagrama da figura 5 por um retângulo. Foram utilizados os mesmos eletrodos de aço inox do circuito anterior.

Organismos assim estimulados foram utilizados nos experimentos descritos adiante, daqui para a frente denominados "células estimuladas" ou "organismos estimulados".

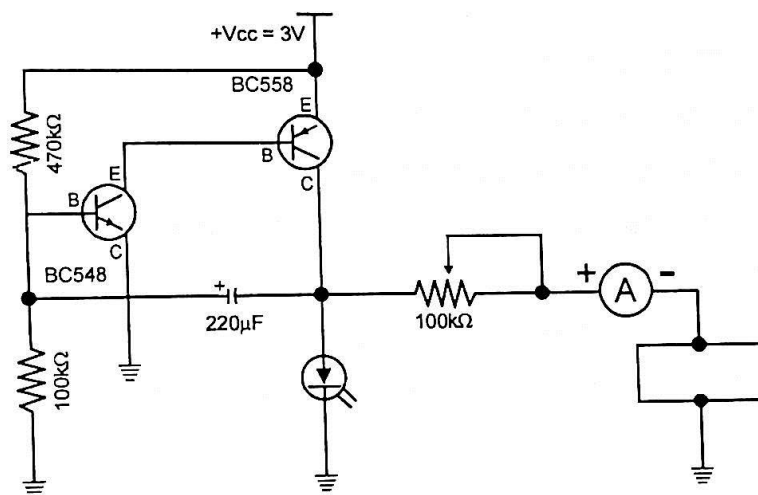


Figura 5: Diagrama ilustrando o circuito utilizado para o estímulo elétrico dos organismos.

### Isolamento e estudo dos ossículos inteiros

*Spirostomum ambiguum* já isolados da cultura normal, e organismos submetidos ao estímulo elétrico, foram lavados com água mineral, concentrados por centrifugação durante 10 minutos e submetidos a vibrações ultra-sônicas durante 10 minutos para romper as células.

Os ossículos foram concentrados novamente por centrifugação durante 10 minutos e suspensos em água.

A fim de verificar a fração com a maior concentração de ossículos utilizamos o princípio da absorção óptica (Lehninger, 1975).

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Hewlett-Packard 8452A (190 a 820 nm). As amostras do fundo do tubo de ensaio foram transferidas para a cubeta quadrada de quartzo de caminho óptico 10 mm. O mesmo procedimento foi feito com



uma suspensão de esmalte de dente humano triturado com broca de diamante para usar como amostra padrão.

Alíquotas de ossículos isolados a partir de células normais e estimuladas conforme o item anterior, foram analisadas no espectrofotômetro para observar a região no tubo de ensaio onde haveria a maior concentração de ossículos isolados para podermos coletar e analisar nos microscópios eletrônicos de varredura e transmissão.

Para o estudo no microscópio eletrônico de transmissão (MET) uma gota da amostra (água mineral + ossículos) foi transferida com o auxílio de uma micropipeta para a tela de cobre, revestida com filme suporte de parafina e cobertura de carbono.

Estas amostras foram estudadas quanto à morfologia, sem nenhum tratamento adicional. As mesmas preparações foram estudadas por difração eletrônica de área selecionada (DEAS), por campo escuro, e por microanálise no MET.

Para calibrar a constante de câmara ( $\lambda L$ ) usada no microscópio eletrônico partiu-se de:

$$2\lambda L = a^2 R / (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$$

$$d_{\text{exp}} = 2\lambda L / \phi$$

R: Raio dos anéis de difração da amostra padrão.

a: Parâmetro de rede do ouro

[sistema cúbico de face centrada  $a=b=c=4,0786(2) \text{ \AA}$ ].

$\phi$ : Diâmetro do anel do diagrama de difração eletrônica do material estudado.

Para determinar a constante de câmara ( $\lambda L$ ) utilizou-se um padrão de difração bem conhecido, no nosso caso, utilizamos o ouro (Au). A partir dos anéis de difração e da estrutura conhecida do ouro, identificamos os diagramas de hidroxiapatita.

O diagrama de difração eletrônica do ossículo foi registrado sempre, antes da imagem do ossículo, para evitar que a estrutura cristalina sofresse danos térmicos podendo alterar-se devido ao intenso feixe de elétrons.

Para o estudo morfológico e microanálise dos ossículos no microscópio eletrônico de varredura (MEV), a amostra foi gotejada sobre o "stub" coberto com fita adesiva de carbono dupla face e em seguida coberta com carbono. Preferiu-se a cobertura com

carbono a ouro uma vez que a emissão de fótons da camada M do ouro (Au) se encontra em torno de 2,21 keV, que coincide com a emissão de fótons da camada K do fósforo (P) em torno de 2,15 keV. O evaporador de carbono utilizado foi o modelo Kinney KSE-2.

Algumas amostras foram conservadas no congelador por tempo maior, e então descongeladas, dispersas diretamente sobre o suporte metálico e recobertas com ouro por "sputtering". Esta nova preparação foi também estudada no MEV para morfologia e microanálise, para comparação.

### **Organismos inteiros**

*Spirostomum ambiguum* foram fixados utilizando-se para isto o fixador de Tamm e Tamm (1981) contendo 2,5% de glutaraldeído, tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,3 e OsO<sub>4</sub> a 4%, por 15 minutos. Após lavagens com o tampão o material foi pós-fixado em glutaraldeído a 2,5% diluído em tampão cacodilato pH 7,3, por 2 horas. Lavagens com o mesmo tampão cacodilato foram feitas várias vezes e, a desidratação foi feita em etanol a 50%-70%-80%-95%-100%.

Em seguida fez-se a secagem pelo método do ponto crítico usando CO<sub>2</sub>, em aparelho construído no laboratório.

As células secas foram montadas em suportes para o MEV usando fita adesiva dupla face e cobertas com ouro por "sputtering", usando-se o equipamento Edwards S150 com os seguintes parâmetros experimentais ajustados:

Corrente total = 5 mA; Tempo = 4 minutos; Pressão = 10<sup>-2</sup> Torr.

Os microscópios de varredura utilizados foram: Jeol 840A, Philips XL30 e LEO440I equipado para microanálise, usando o espectrômetro para energia dispersiva (EDS).

### Cortes ultra-finos

O material foi fixado e desidratado como para o MEV.

Após a etapa de desidratação com etanol a 100%, foi feita a infiltração com óxido de propileno e inclusão na resina Ladd LX-112, que foi polimerizada a 60°C por 5 dias para cortes ultra-finos.

Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalhas de vidro ou de diamante no ultra-micrótomo Sorvall MT-2B "Porter Blum".

Cortes transversais e oblíquos foram obtidos na espessura de 90(15) nm e 150(15) nm, coletados sobre telas de cobre e corados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo.

### Experimento citoquímico

A fim de verificar a existência e possível localização da enzima fosfatase alcalina, foi utilizado o método de Mayahara et al. (1967) utilizando-se  $\beta$  glicerofosfato de sódio como substrato.

*Spirostomum ambiguum* foram fixados diretamente em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3, por 30 minutos.

Após a fixação, foram lavados em tampão e incubados a 37°C durante 30 minutos.

O meio de incubação consistiu em: 1,4 ml de tampão tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 (28 mM em sua concentração final), 2,0 ml de  $\beta$  glicerofosfato de sódio (20 mM), 2,6 ml de sulfato de magnésio 15 mM (3,9 mM) e 4,0 ml de solução saturada de citrato de chumbo alcalino (aproximadamente 0,5%), pH 10,0 (2,0 mM).

A solução saturada de citrato de chumbo alcalino foi filtrada antes do uso.

Após a incubação foram re-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora à temperatura ambiente, progressivamente desidratados em etanol, óxido de propileno e embebidos em resina Ladd LX-112.

Preparações controle consistiram na incubação no mesmo meio de Mayahara et al. (1967) omitindo-se o substrato.

Em seguida as células foram transferidas para moldes contendo resina e polimerizadas durante 5 dias a aproximadamente 60°C. Cortes ultra-finos foram

obtidos nas espessuras de 90(15) nm e 150(15) nm e observados com ou sem coloração, no MET.

A fim de confirmar a reação positiva da enzima, fizemos microanálise dos cortes não corados nas preparações de reação citoquímica e de controle, procurando identificar o precipitado de chumbo principalmente na região dos ossículos.

O material foi observado nos microscópios de transmissão: Siemens Elmiskop 101 operado a 100 kV; JEOL 200C e Philips CM-200 operados a 200 kV. Este último acha-se equipado com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) com o qual se processou à microanálise e os diagramas eletrônicos de área selecionada (DEAS).

A partir das medidas das dimensões dos cristalitos observados nas micrografias de transmissão e utilizando o programa Powder Cell (Kraus e Nolze, 1996) foi feito um modelo para o cristal de hidroxiapatita encontrado no *Spirostomum ambiguum*, no qual se pode verificar a distribuição dos elementos químicos.

### III. Resultados

Plantas provenientes do tanque da Botânica-USP e de lojas de aquário constituíram a fonte mais rica de *Spirostomum*, possibilitando assim o seu isolamento e sub-cultivo por longos períodos no laboratório. Em amostras de outras procedências não houve o aparecimento de *Spirostomum ambiguum* (figura 1).

Decorridas algumas semanas no laboratório apareceram nas plantas em decomposição, milhares de outros protozoários como *Paramecium*, *Didinium* e *Euplotes* e metazoários como *Catenula*, *Stenostomum*, Rotíferos, Poliquetos, etc. Alguns destes microorganismos são predadores de *Spirostomum* e também entram em competição pelas bactérias que constituem a fonte alimentar do *Spirostomum*, razão pela qual há um decréscimo rápido desta população.

Portanto o isolamento e sub-cultivo de *Spirostomum* foi condição necessária para podermos obter grande quantidade do mesmo para o estudo, assim viabilizando isolar os agregados de hidroxiapatita de seu interior. A rede de nylon serviu eficientemente na separação de *Spirostomum* dos organismos maiores, e de detritos.

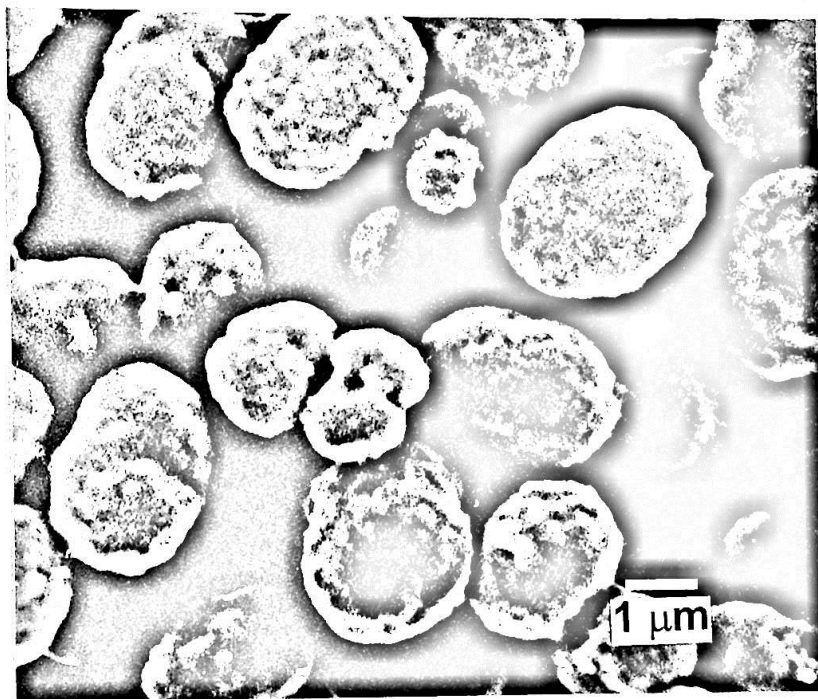
A utilização da areia ao invés de terra na sub-cultura, além de não deixar a água turva (figura 4), possibilitou-nos observações *in vivo* dos animais, assim como o comportamento de "enterramento" dos *Spirostomum* já anteriormente notado por Pautard (1959). Foi também um método de reter bactérias anaeróbicas; no isolamento dos organismos para os experimentos conseguiu-se retirar a areia facilmente, filtrando a água novamente com as redes de nylon e usando micropipetas.

A utilização do circuito revelou-se um método eficiente para isolar e coletar *Spirostomum* dos outros organismos para fazer a sub-cultura. Usou-se uma corrente de até 500  $\mu$ A, suficiente para o isolamento, visto que correntes muito altas induziam à deformação e desintegração das células. Em nossa experiência, *Spirostomum ambiguum* comportou-se de modo diferente do descrito pela literatura, isto é, não mostrou galvanotaxia transversa e ficou imóvel sem nenhuma orientação preferencial.

Nosso procedimento forneceu um método limpo, rápido e fácil de isolar os *Spirostomum ambiguum*, e a partir destes os ossículos foram isolados por sonicação.

Foram observados ossículos em indivíduos cultivados no laboratório, mas aqueles coletados diretamente de seu habitat natural já continham essas inclusões.

Ossículos isolados por ultra-som, do *Spirostomum*, formavam agregados esféricos ou oblongos variando de aproximadamente 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  em diâmetro como podemos ver na imagem de varredura (figura 6) usando elétrons secundários.



**Figura 6:** Micrografia de varredura de grupos de ossículos isolados de *Spirostomum ambiguum* estimulado.

A figura 7 mostra a imagem de transmissão de um ossículo isolado. O ossículo apresenta-se denso, com diâmetro da ordem de 1  $\mu\text{m}$ . Na periferia do agregado se pode notar cristais aciculares orientados radialmente. Em aumento maior (figura 8) verifica-se que os cristais têm forma de bastonetes, pouco densos ao feixe eletrônico, com a largura da ordem de 40(20) Å. As medições foram feitas no positivo de transmissão, utilizando escala graduada em milímetros.

A aplicação do estímulo elétrico durante 1 semana resultou no aumento do número de ossículos nos organismos vivos, e uma alteração na distribuição dos cristais individuais, como pode ser observado comparando as amostras isoladas de células não sujeitas a estímulo elétrico (figuras 7 e 8) com amostras de organismos estimulados (figuras 6 e 9). Houve uma mudança na morfologia de forma originalmente acicular como se vê na figura 7, para forma de plaqueta (figura 9). Aparentemente, as agulhas se re-orientam para constituir placas, visíveis nas imagens de superfície dos ossículos. Portanto os ossículos induzidos a crescer experimentalmente se comportaram como um material piezoelétrico.



As duas populações de ossículos foram analisadas no espectrofotômetro.

O experimento de absorção óptica mostrou o aparecimento de um pico na região do vermelho na faixa de 650 nm para as duas sub-culturas examinadas. Os dados pertinentes aos ossículos acham-se na Tabela 1. A absorbância do esmalte do dente humano em 656 nm foi de 0,173. Ossículos isolados de organismos não estimulados apresentaram absorbância de 0,014 em relação à água destilada. Ossículos de organismos estimulados durante 1 semana mostraram um aumento relativo na absorbância, para 0,038. Isto indica que a aplicação do estímulo elétrico induziu um aumento nos depósitos de hidroxiapatita (calcificação estimulada por efeito piezoelétrico).

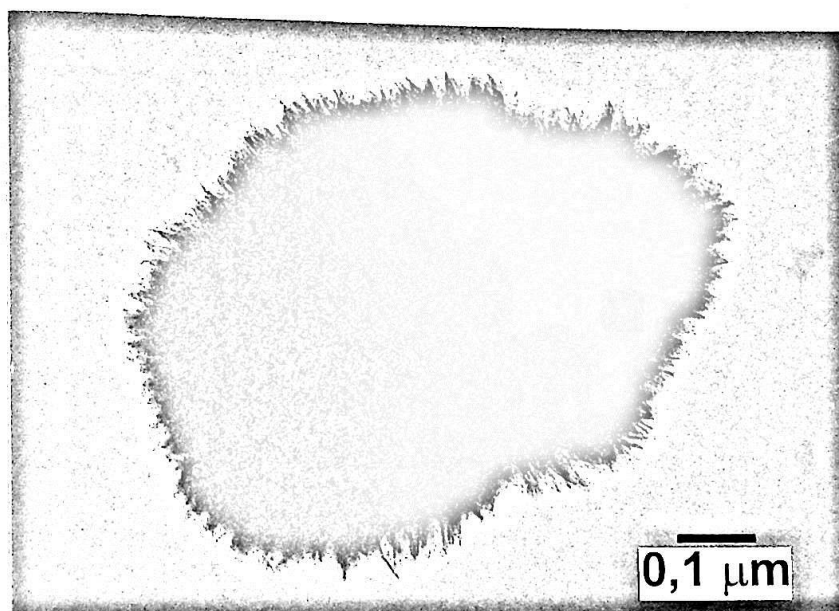
**Tabela 1** – Características da absorbância para as duas populações de ossículos

Origem dos cristais	$\lambda$ (nm)	Absorbância
Células não estimuladas	658	0,014
Células estimuladas	656	0,038

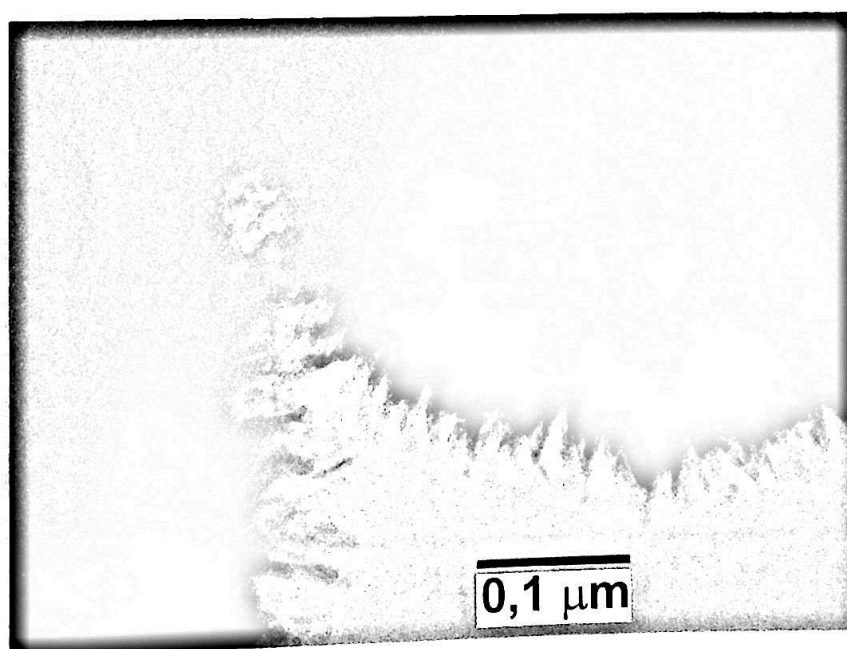
Os valores máximos de absorbância correspondiam à parte inferior do tubo de ensaio onde se concentrava a maior quantidade de ossículos, possibilitando assim selecionar esta região para sua coleta com a micropipeta, usando-a para o estudo nos microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura.

No presente experimento, não se pretendia determinar o coeficiente de absorção óptica das suspensões; o espectrofotômetro foi apenas utilizado para se determinar de modo relativo, a fração da suspensão com maior densidade óptica, e portanto, com maior probabilidade de conter alta concentração de cristais de hidroxiapatita.

O espectro de microanálise dos ossículos isolados, obtido no MEV (figura 10) mostrou-nos picos de cálcio e fósforo, com a razão Ca/P 1,57(1). Esta razão está dentro do valor esperado para hidroxiapatita (Guyton, 1977). Picos menores de Mg, Na, K, Cl e O também estavam presentes. O interessante é que estes mesmos elementos também se encontram em ossos de vertebrados (Guyton, 1977).

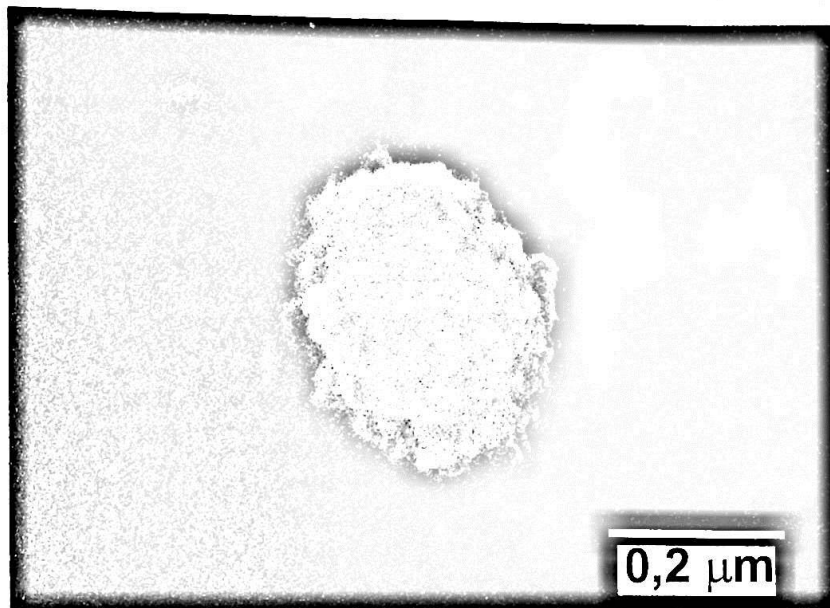


**Figura 7:** Micrografia de transmissão de ossículo isolado de um organismo não estimulado.

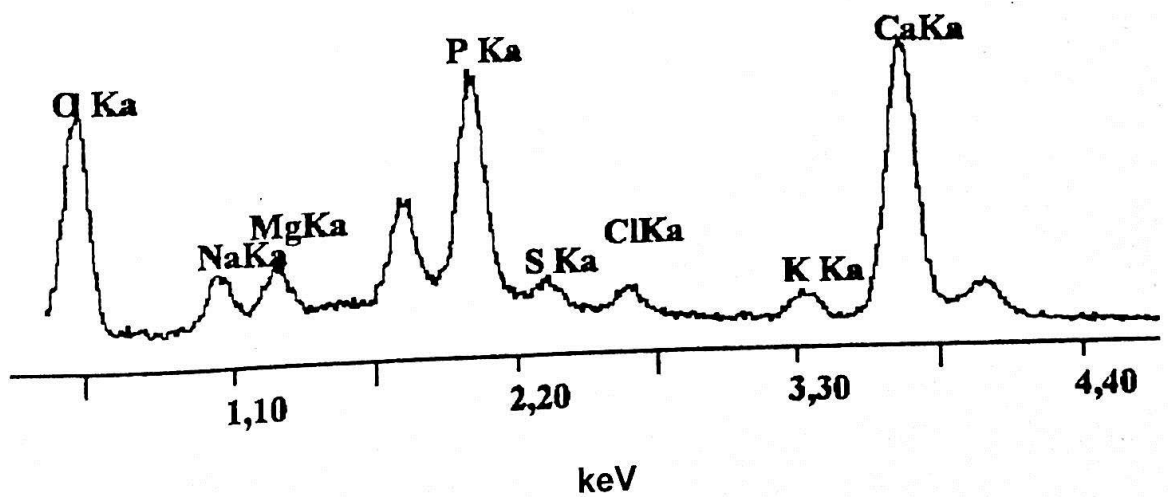


**Figura 8:** Vista ampliada da periferia de dois ossículos, notando-se a disposição radial dos cristalitos.





**Figura 9:** Micrografia de varredura de um ossículo isolado, com cristais de hidroxiapatita em forma de plaquetas angulosas obtido a partir de célula estimulada eletricamente.



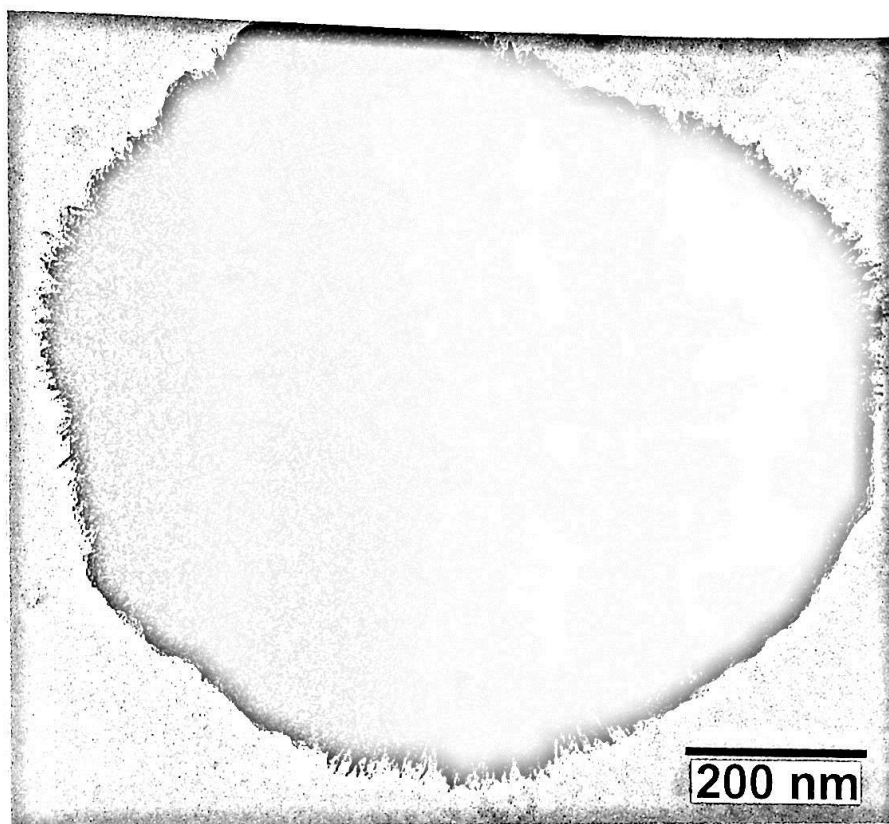
**Figura 10:** Espectro de microanálise correspondente ao ossículo da figura 9 mostrando os picos K $\alpha$  de cálcio e fósforo.

Para os organismos estimulados eletricamente, pode-se verificar que ocorreu um re-arranjo aparente pelo menos na superfície do ossículo, que apresenta um perfil mais arredondado, sem agulhas perceptíveis (figura 12a). Estas imagens obtidas por MEV não puderam ainda ser confirmadas por MET.

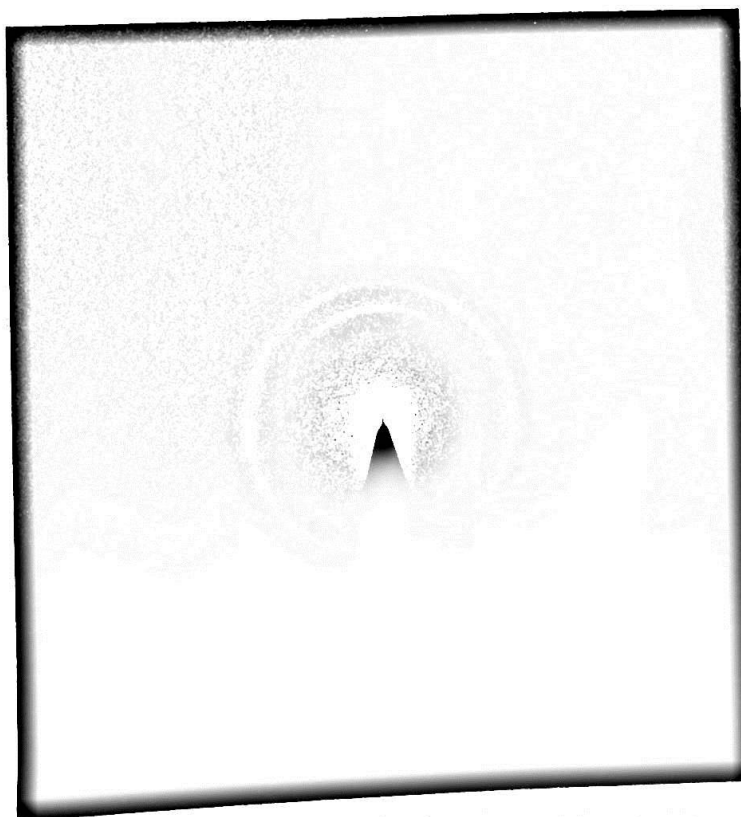
O exame dos ossículos isolados de *Spirostomum ambiguum* tanto submetidos ao estímulo elétrico como os naturais, foram analisados por DEAS e, apresentaram diagramas de difração típicos de hidroxiapatita (Weast, 1974). Calculando o diagrama de difração teórico a partir de coordenadas atômicas, conseguimos identificar os anéis de difração. No diagrama de difração previsto teoricamente para hidroxiapatita há muito mais anéis de difração. Pelo fato de a difração ocorrer somente em algumas direções, entendemos que as amostras estão orientadas preferencialmente nos eixos cristalinos que estão indicados nas tabelas 2-1, 2-2. Verificamos na figura 12b) que partes dos anéis ficaram mais intensas à custa de outras regiões, portanto trata-se de um diagrama de textura.

Interessante notar que a texturização da hidroxiapatita mudou quando submetemos os protozoários a um campo elétrico. Antes de aplicar o campo elétrico somente observamos as reflexões (201), (102), (211), (213) e (033). Depois de aplicar o campo elétrico agora novas reflexões apareceram: (013), (400), (232), (300), (224) e (234).

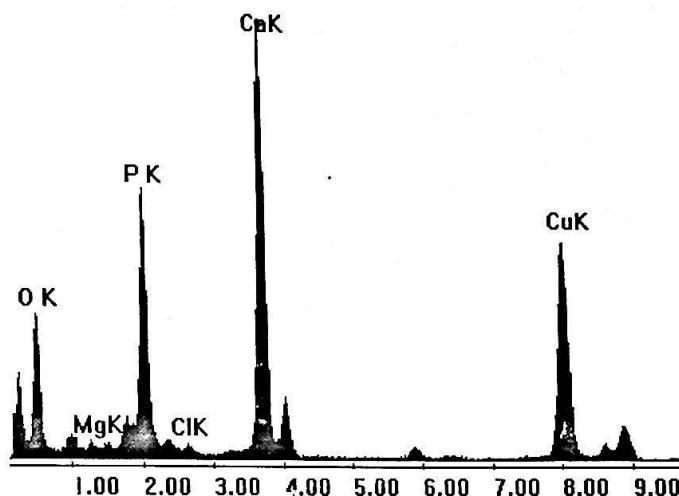
No espectro de microanálise correspondente ao ossículo do organismo estimulado eletricamente (figura 12c) constatou-se a presença de outros elementos químicos que não haviam sido detectados no ossículo do organismo não estimulado (figura 11c).



**Figura 11 a)** Ossículo de hidroxiapatita isolado de um organismo controle (sem estímulo elétrico).



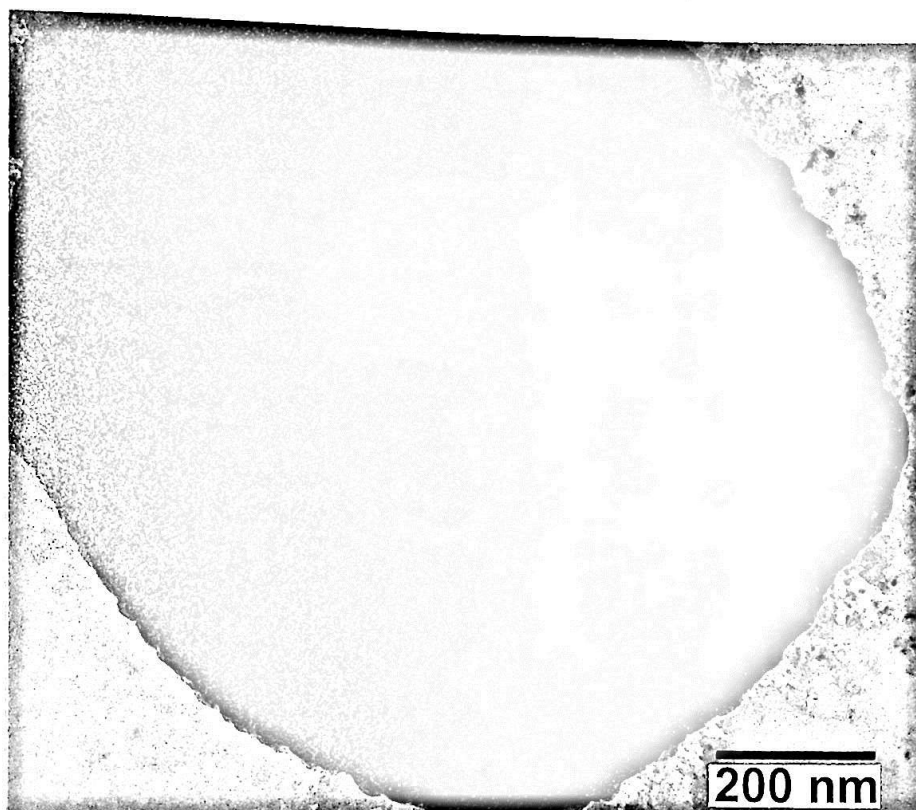
**Figura 11 b)** Diagrama de difração eletrônica de área selecionada correspondendo ao ossículo da figura anterior.



**Figura 11 c)** Espectro de microanálise do ossículo isolado, visto na figura 11 a).

A micrografia eletrônica de transmissão do ossículo isolado do organismo controle (sem estímulo elétrico) mostra os cristais orientados radialmente com forma aparentemente acicular (figura 11a). A microanálise correspondente apresentou picos de emissão de energia de cálcio e fósforo (figura 11 c).

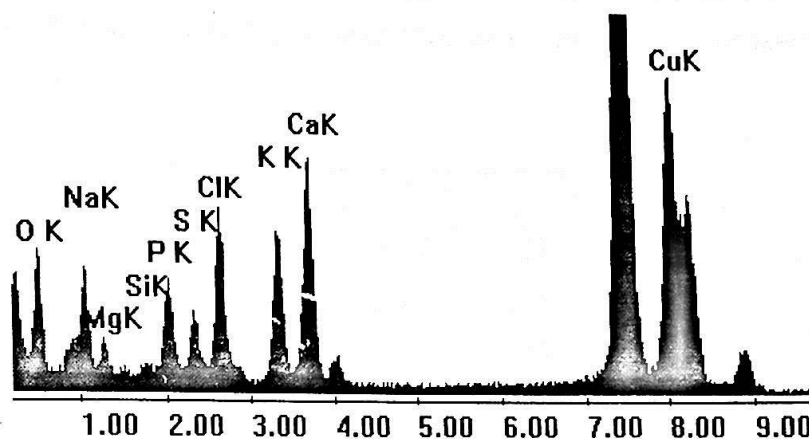
No diagrama de difração eletrônica de área selecionada correspondente ao ossículo da figura 12a) podemos observar um aumento no número de anéis de difração, cuja medida também nos indicou padrões típicos de hidroxiapatita. O espectro de microanálise obtido do respectivo ossículo, além de nos fornecer os picos de Ca e P, indicou picos mais salientes de K, Cl, Mg, Na e O (figura 12c) em relação ao espectro anterior.



**Figura 12 a)** Ossículo de hidroxiapatita isolado de um organismo submetido a estímulos elétricos.



**Figura 12 b)** Diagrama de difração eletrônica de área selecionada correspondendo ao ossículo da figura anterior.



**Figura 12 c)** Espectro de microanálise do ossículo estimulado, mostrado na figura 12 a).

Conclui-se portanto que a aplicação do estímulo elétrico induziu um aumento na calcificação dos organismos.

Apresentamos na tabela 2-1 e 2-2 a indexação da difração eletrônica de área selecionada referente respectivamente aos ossículos de organismos submetidos e não submetidos a estímulo elétrico.

**Tabela 2-1** - Análise por DEAS do ossículo de um organismo não tratado com estímulo elétrico. As distâncias interplanares experimental ( $d_{exp}$ ) e teórica ( $d_{teo}$ ) e os índices de Miller (hkl) foram calculados a partir do diagrama de difração eletrônica.

$d_{exp}$ (Å)	$d_{teo}$ (Å)	hkl
3,50(3)	3,51	201
3,22(3)	3,17	102
2,85(3)	2,81	211
1,86(3)	1,87	213
1,75(3)	1,75	033

**Tabela 2-2** – Resultados da análise por DEAS do ossículo de um organismo sujeito a estímulo elétrico. As distâncias interplanares experimental ( $d_{exp}$ ) e teórica ( $d_{teo}$ ) e os índices de Miller (hkl) foram calculados a partir do diagrama de difração eletrônica, supondo o material tratar-se de hidroxiapatita.

$d_{exp}(\text{Å})$	$d_{teo}(\text{Å})$	hkl
3,17(3)	3,17	102
2,85(3)	2,81	211
2,22(3)	2,21	013
2,02(3)	2,04	400
1,81(3)	1,81	213
1,66(3)	1,64	232
1,57(3)	1,57	330
1,40(3)	1,39	224
1,28(3)	1,28	234

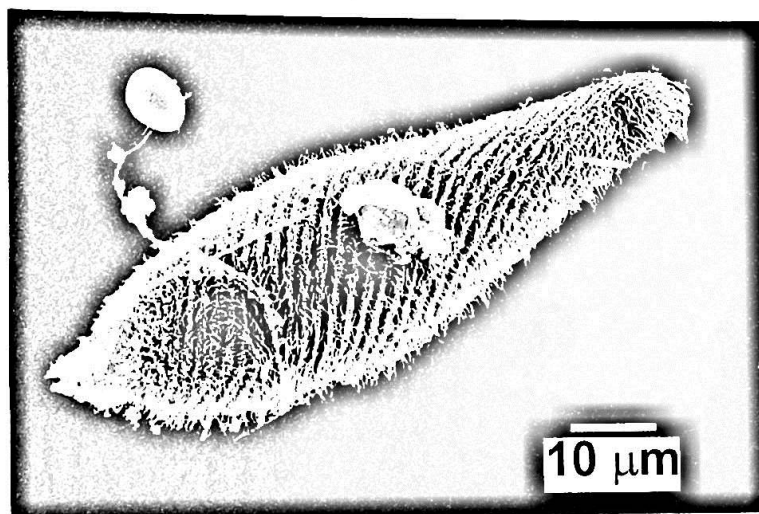
A fixação da célula inteira com o fixador Tamm e Tamm (1981) preservou muito bem a morfologia externa do animal, apesar da célula estar sempre contraída, devido ao próprio estímulo do fixador químico. Na figura 1 podemos observar a forma geral da célula que se assemelha a um fuso, e a membranela situada na parte anterior do animal (lado esquerdo da figura).

Espécimens mantidos em jejum por 3 meses revelaram uma mudança progressiva na morfologia, passando gradualmente da forma alongada para a forma supostamente final, quase esférica (figura 15). Alguns estágios intermediários com forma de "pera" (figura 13) e "coxinhas" (figura 14) também foram observados.

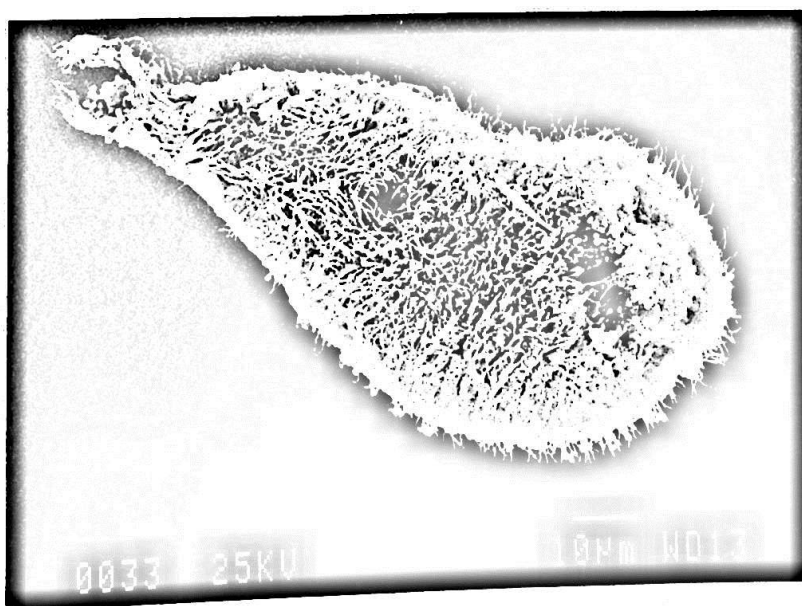
Essa mudança de forma e redução de tamanho relacionada com o acúmulo de ossículos, é também visível por transparência no organismo vivo, examinado no microscópio de luz.



A figura 16 compara as dimensões de um organismo antes do início da mudança morfológica com outro em estágio avançado de alteração (quase em forma esférica).



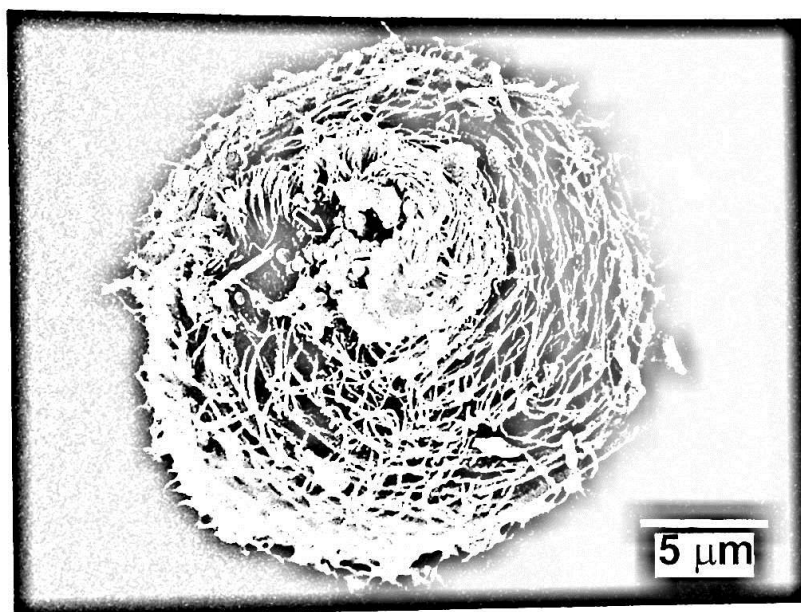
**Figura 13:** *Spirostomum ambiguum* em forma de "pera". Estágio anterior à forma de "coxinha".



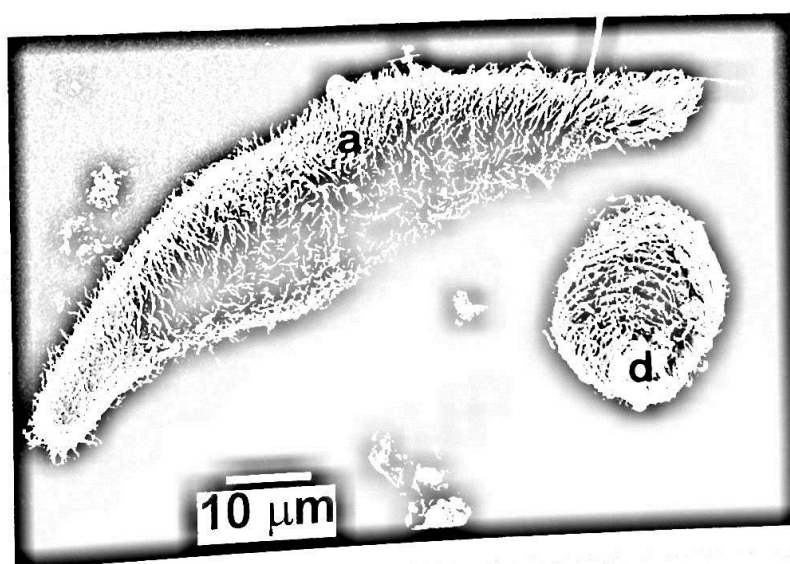
**Figura 14:** *Spirostomum ambiguum* em formato de "coxinha".



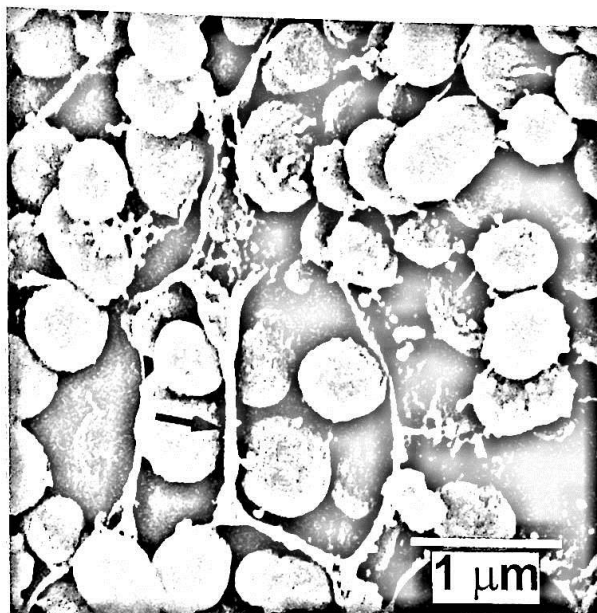
Quando a célula se rompia, podia-se observar no MEV animais carregados com inclusões minerais acumuladas na parte anterior próxima ao peristômio (figura 15). Estes agregados de minerais aparecem como partículas arredondadas, com diâmetro próximo a  $1 \mu\text{m}$ . Nas imediações se notam vestígios de membranas (figura 17). Procedeu-se à microanálise destes agregados no MEV. A composição inorgânica de Ca e P obtida nesta análise semi-quantitativa é mostrada na tabela 3.



**Figura 15:** *Spirostomum ambiguum* em forma de "esfera" com os agregados de hidroxiapatita na região do peristômio (seta).



**Figura 16:** Micrografia comparativa da variação da morfologia de *Spirostomum ambiguum* quando em regime de jejum. a) Organismo normal; d) Organismo na fase final.



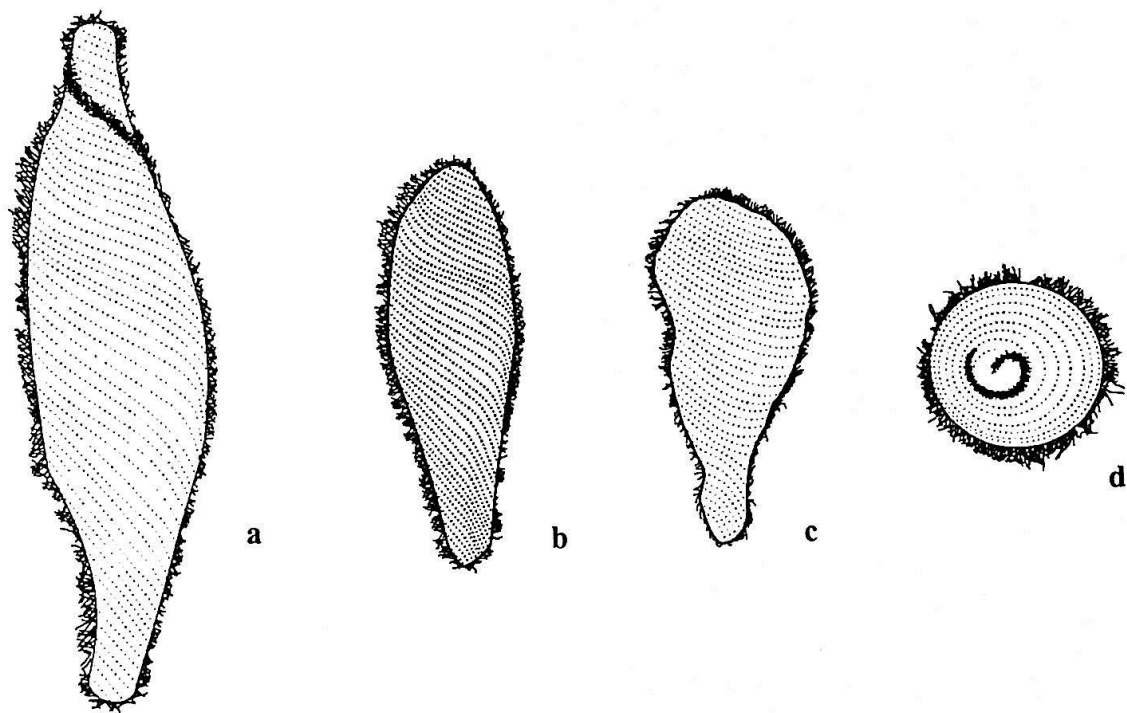
**Figura 17:** Ossículos acumulados na superfície de um *Spirostomum ambiguum* mantido em jejum. Observam-se fragmentos de membranas (→).

**Tabela 3** – Percentagem atômica de cálcio e fósforo das estruturas arredondadas mostradas na figura 17.

Elemento	% Atômico
Ca	12,29
P	7,96

O percentual atômico dos elementos acima tabelados indica que estas estruturas seriam agregados de hidroxiapatita.

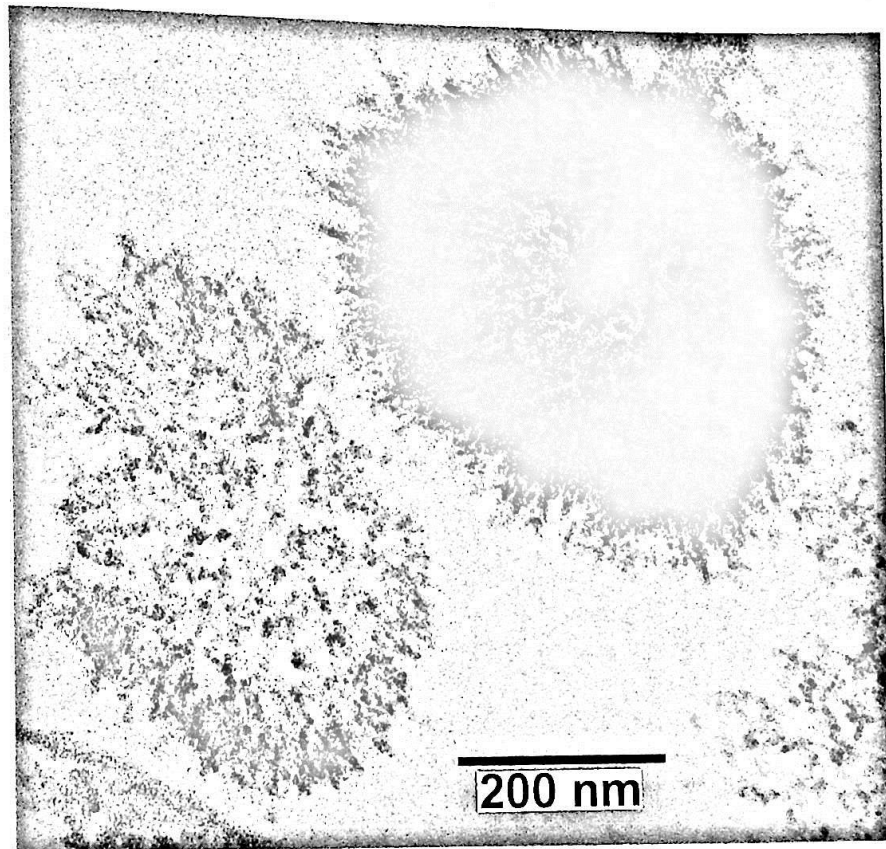
O esquema da figura 18 esquematiza a mudança morfológica dos organismos vivos observados através da microscopia de luz e também a partir de imagens de microscopia de varredura, durante o regime de jejum. No desenho, os organismos se encontram contraídos tanto no comprimento como no diâmetro, tendo um componente em forma de torção, devido à fixação química. As linhas pontilhadas correspondem aos cinetídeos onde se inserem os cílios locomotores, de modo regular.



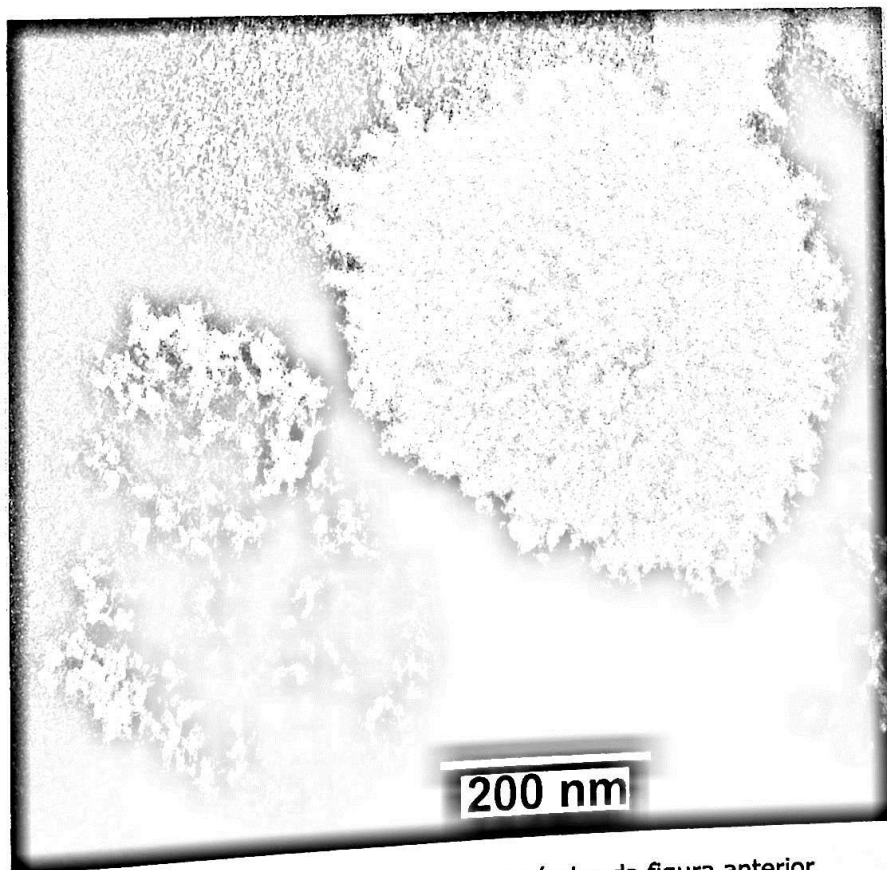
**Figura 18:** Desenho esquemático baseado nas imagens de organismos vivos e de imagens de MEV mostrando a variação progressiva da morfologia durante o regime de jejum. O comprimento da célula viva varia de 150 a 3000  $\mu\text{m}$ .

Cortes ultra-finos dos organismos inteiros mostraram ossículos localizados em várias partes da célula, usualmente dentro de um vacúolo, mas alguns deles sem nenhuma membrana envolvente.

A mesma estrutura já descrita para os ossículos isolados, com cristais de hidroxiapatita dispostos radialmente é aparente nos cortes, tanto tangenciais como internamente (figura 19). Nesta figura temos um corte de um organismo corado com acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e citrato de chumbo durante 7 minutos.

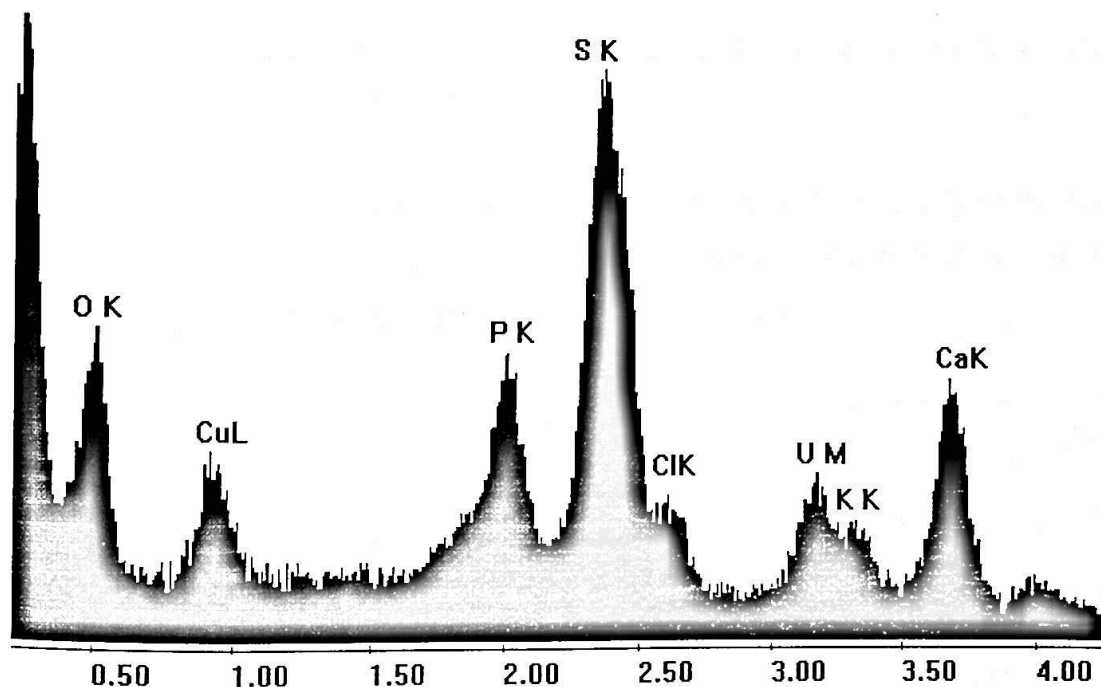


**Figura 19:** Micrografia eletrônica de ossículos vistos em corte ultra-fino (campo claro).



**Figura 20:** Imagem de campo escuro dos mesmos ossículos da figura anterior.

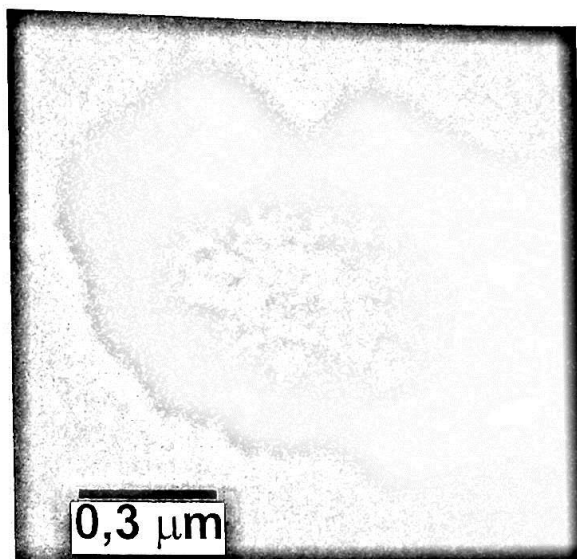
Imagens de campo escuro do mesmo corte mostram a reversão de contraste (figura 20). Podemos notar nos ossículos regiões brilhantes localizadas, indicando a presença de cristais orientados corretamente para ocorrer difração de elétrons pelos planos cristalinos. Observa-se que outras áreas do mesmo ossículo com orientação não adequada, apresentam baixo contraste. Em campo escuro, os cristalitos aparecem como pontos brilhantes bem definidos contra a fraca intensidade produzida pelo espalhamento difuso do agregado. Uma microanálise feita na mesma região revelou nos picos de cálcio e fósforo, conforme mostra a figura 21.



**Figura 21:** Espectro de microanálise correspondente aos ossículos da figura 20. Intensidade (u.a.) versus energia (keV).

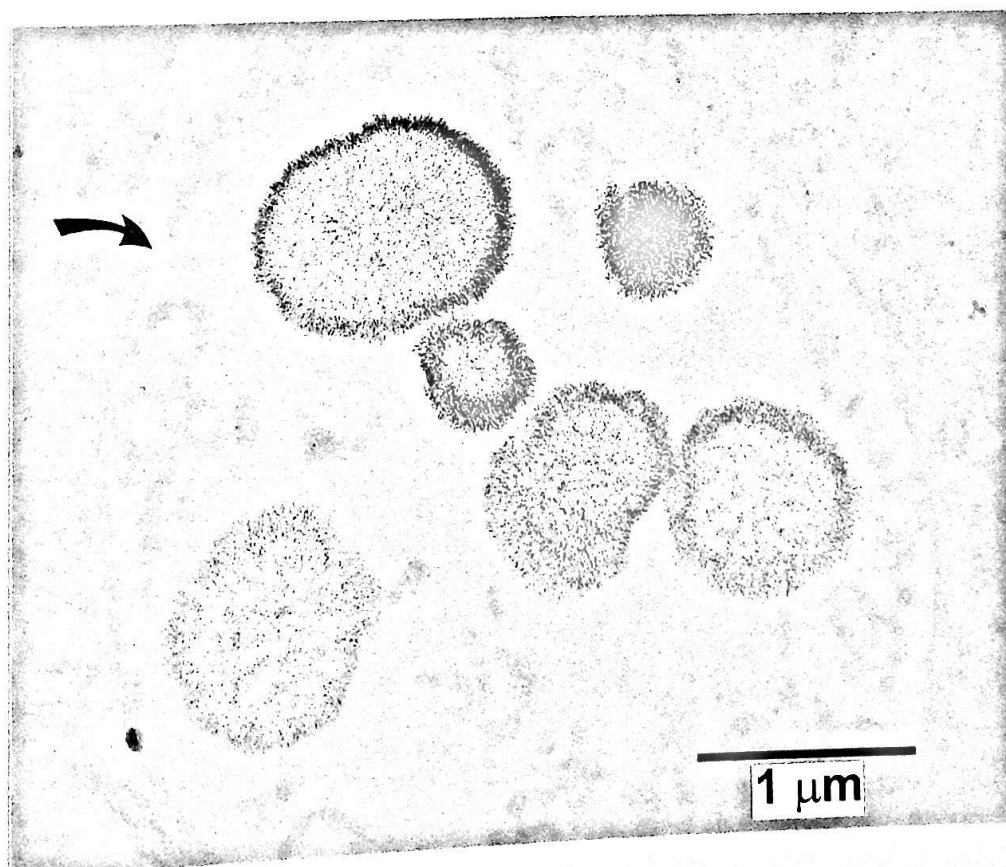
A aplicação do método de Mayahara et al. (1967) permitiu identificar nos cortes, os sítios da atividade enzimática para a fosfatase alcalina. As figuras 22 a 25 mostram que o precipitado de chumbo ocorria principalmente na periferia dos ossículos. Isto é bem evidente em corte mais espesso de 150(15) nm (figura 22).





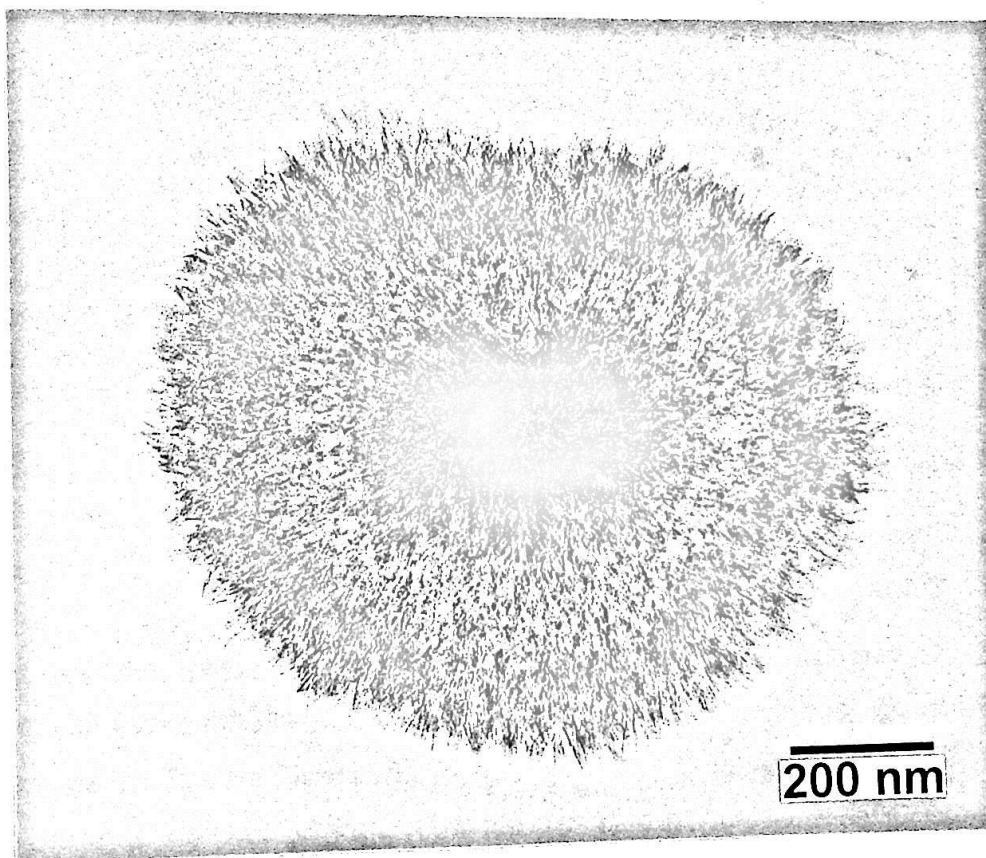
**Figura 22:** Depósito da reação acumulado principalmente na periferia do ossículo. Secção espessa, fotografada no MET Jeol 200C.

Vários ossículos ocorriam localizados dentro de um vacúolo comum (figura 23). Nesta figura se pode notar uma densidade maior na camada superficial em cada ossículo, e que corresponde ao precipitado de chumbo.



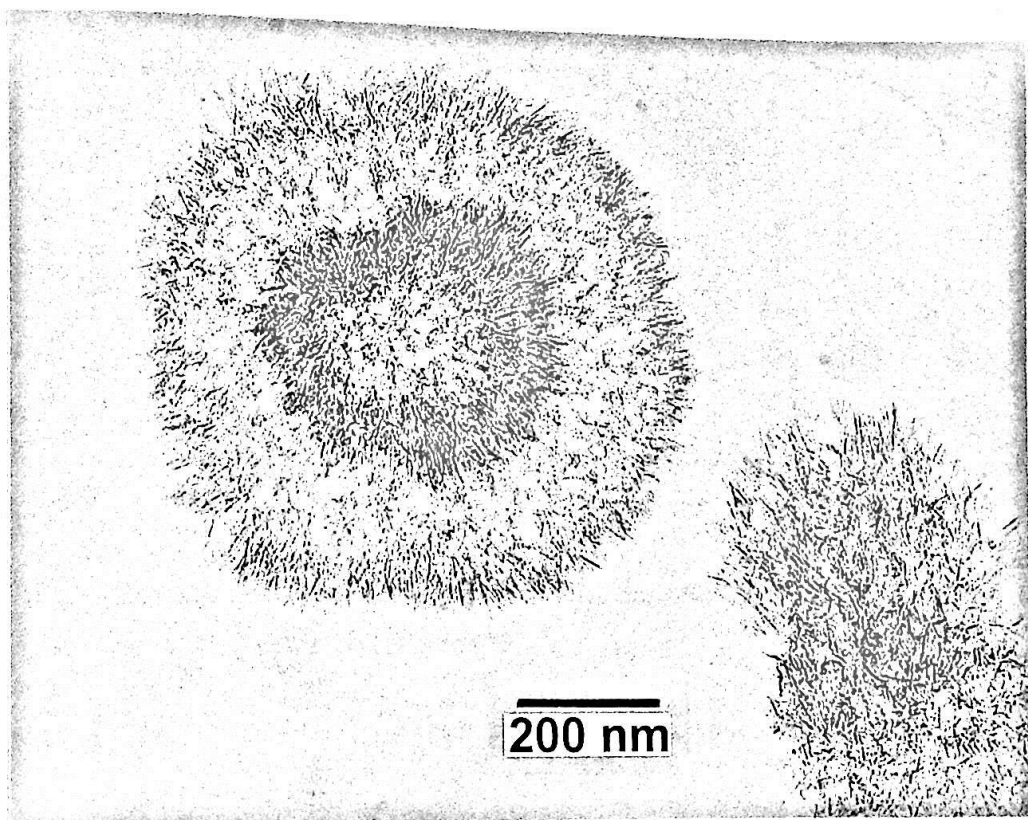
**Figura 23:** Vacúolo delimitado por membrana (→) contendo vários ossículos.

Vários ossículos apresentaram em corte, uma alternância de densidade, em camadas, (figuras 24 e 25) com regiões mais densas na periferia. Estas imagens sugerem que a calcificação se processa em etapas sucessivas, a partir de um nódulo que seria acrescido por mais unidades depositadas radialmente, ou seja, uma calcificação concêntrica.



**Figuras 24 e 25:** Micrografias mostrando mineralização concêntrica em forma de anéis.



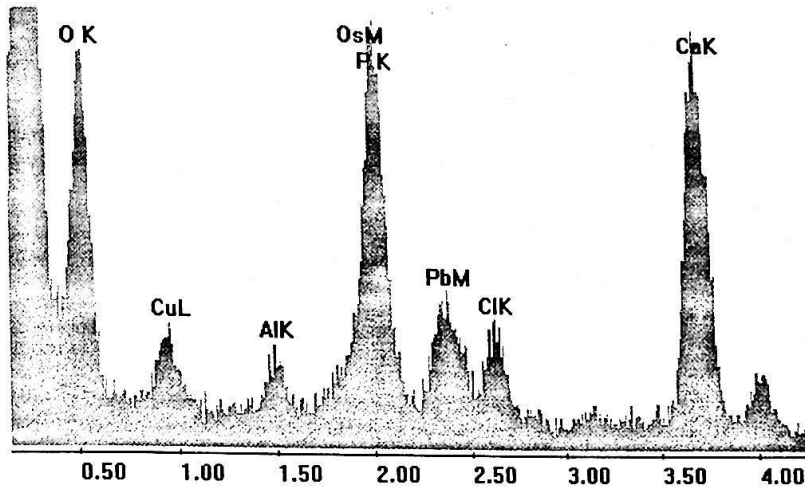


**Figura 25**

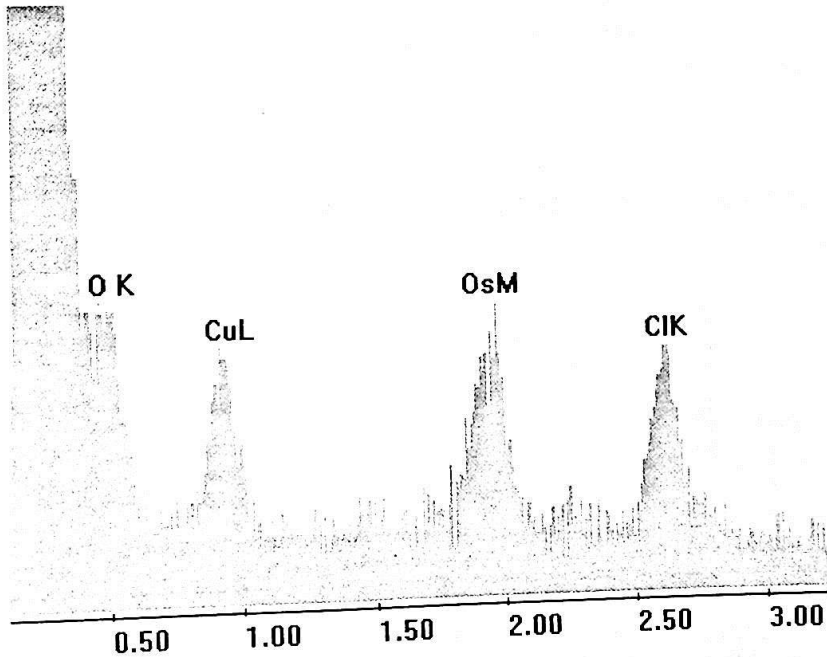
Os ossículos apresentaram atividade enzimática, indicada pelas figuras 22-25, com precipitação localizada do produto final da reação (chumbo), o que não ocorreu nas preparações de controle (figura 28).

A presença do chumbo foi confirmada por meio de microanálise. O espectro da figura 26 indica um precipitado de chumbo referente a um ossículo incubado no meio completo (reação positiva).

Organelas celulares como mitocôndrias e outras, foram negativas para a atividade enzimática. Nestas regiões, a microanálise não detectou chumbo (figura 27).

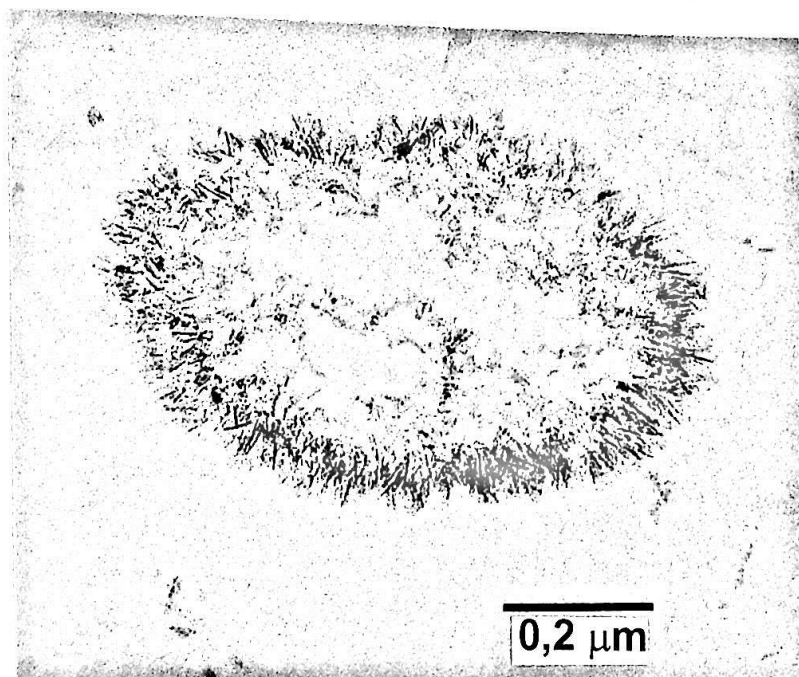


**Figura 26:** Espectro de microanálise mostrando além dos picos de cálcio (Ca) e fósforo (P), um pico aparente de chumbo (Pb).

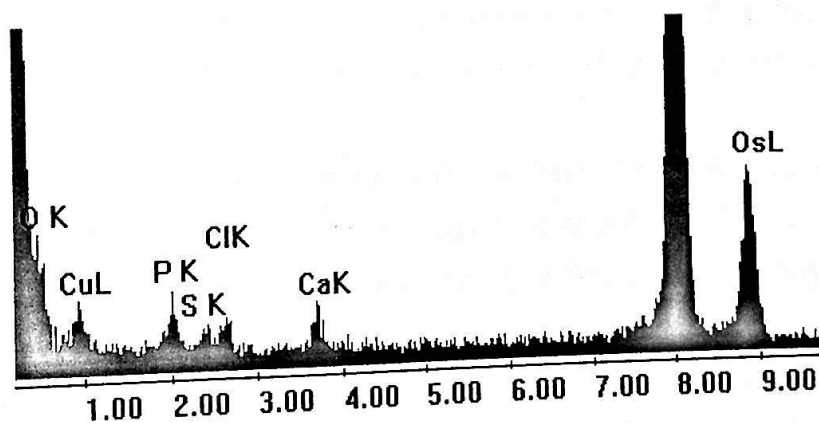


**Figura 27:** Espectro de microanálise de uma das mitocôndrias de *Spirostomum ambiguum*.  
Nota-se a ausência de Pb.

Nos organismos incubados sem o substrato, também não se observou o produto da reação (figura 28) o que foi confirmado pelo espectro de microanálise correspondente, mostrado na figura 29.

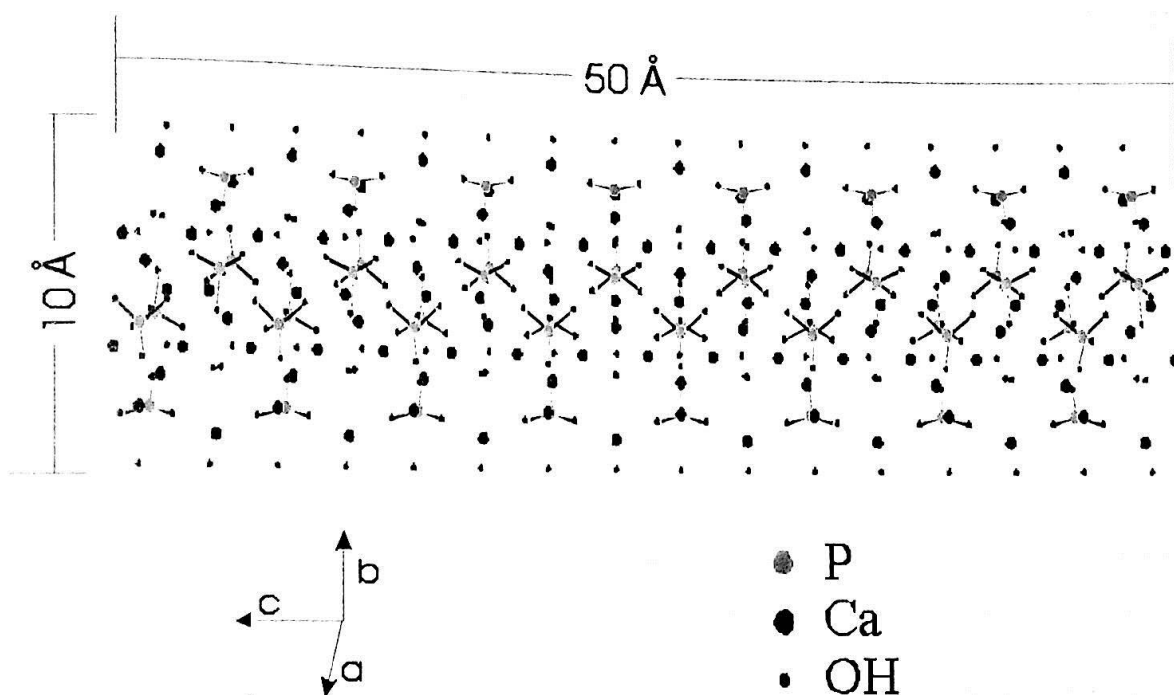


**Figura 28:** Micrografia de transmissão da amostra controle (sem substrato).



**Figura 29:** Espectro de microanálise do ossículo da amostra controle, sem o pico de Pb.

A partir das medidas tomadas de largura e comprimento dos cristais estudados, e utilizando o programa Powder Cell (Kraus e Nolze, 1996) e os dados cristalográficos de hidroxiapatita (Hendricks et al, 1932) foi possível elaborar uma representação esquemática de um cristal de hidroxiapatita de *Spirostomum ambiguum* (figura 30). Pudemos verificar utilizando este programa, que os cristais possuem a dimensão de 210(20) Å no eixo c por 40(20) Å nos outros dois (a, b) (a escolha dos eixos foi arbitrária).



**Figura 30:** Modelo proposto para um cristal de hidroxiapatita de *Spirostomum ambiguum*, reduzido 1:64 a partir de medidas obtidas em imagens de ossículos isolados e em cortes ultra-finos. Os eixos de crescimento do cristal são também indicados.

De acordo com o modelo, existem aproximadamente 30 células unitárias na direção do eixo c; 4 células unitárias na direção dos eixos a e b.

Reduzimos o modelo do cristal por um fator 64 a fim de não sobrecarregarmos o desenho (diminuindo 4x em cada eixo). Temos em cada célula unitária 44 átomos, portanto 480 células unitárias contém mais de 21120 átomos (4800 de Ca, 12480 de O, 2880 de P e 960 de H). Claro que estes números podem variar, e devem servir somente de estimativa para se ter uma idéia da composição dos cristais. Interessante notar que o modelo representa o cristal em forma de bastonete, sendo de 5 a 10 vezes maior na direção do eixo c.

A partir dos mesmos dados cristalográficos, obtivemos os espectros teóricos de raios-X indicando os picos de intensidades de hidroxiapatita com seus respectivos valores de distâncias interplanares (figura 31) e índices hkl (figura 32). Estes espectros auxiliaram na interpretação dos anéis de diagrama de difração eletrônica de área selecionada.



## IV. Discussão

A deposição de materiais inorgânicos por sistemas biológicos é um fenômeno muito frequente na Natureza; carbonatos de cálcio, sílica amorfa e com menor frequência, apatitas cristalinas, fazem parte das mais de 60 diferentes espécies minerais formadas biologicamente, por integrantes dos mais diversos filos animais e algumas plantas (Mann et al., 1981; Weiner e Addadi, 1997). Um aspecto importante destes biominerais é a notável regularidade de forma das unidades constituintes (Pautard e Williams, 1982). Entre todos estes produtos da biomineralização, osso e dente de vertebrados constituem certamente o exemplo clássico, mais bem estudado e de maior interesse para o homem. Os cristalitos constituintes, fosfatos de cálcio, têm dimensões mínimas e podem ser estudados até com resolução atômica, por microscopia eletrônica.

Conforme consideram Mann e Weiner (1999), o conhecimento das propriedades físicas destes biomateriais, relacionando forma e função é de muito interesse portanto, tanto do ponto de vista biológico, como para aplicações práticas em várias áreas.

*Spirostomum ambiguum*, é considerado até hoje, o único exemplo de um organismo unicelular que sintetiza cristais de hidroxiapatita (Pautard, 1959; Jones, 1967), cristais estes que se assemelham sob vários aspectos, àqueles constituintes do osso e do dente. Algumas destas propriedades foram confirmadas no presente estudo: a composição elementar e a relação Ca/P por meio de microanálise de raios-X; o comportamento piezoelétrico sob ação de um campo estimulante externo; a estrutura cristalina através do DEAS, e a identificação da fosfatase alcalina associada, por método citoquímico.

Idealizamos um sistema para manter no laboratório *Spirostomum ambiguum* em sub-culturas de alta concentração, conforme descrito em Materiais e Métodos. Vinte sub-culturas foram mantidas à temperatura ambiente, durante mais de 15 meses. A partir destas sub-culturas, foi possível isolar com a confecção de um circuito elétrico e micropipetas, grande quantidade de ossículos para estudo. A metodologia exclusivamente física, seguida para isolamento dos ossículos (desintegração com ondas ultra-sônicas; aplicações de potenciais elétricos; medidas no espectrofotômetro óptico; microanálise por EDS; DEAS) evitou contato e interações com reagentes químicos.



Os ossículos isolados foram estudados quanto à morfologia externa por microscopia de varredura e de transmissão. A observação com aumentos maiores na borda destes agregados, revelou que os ossículos são formados por um aglomerado de sub-unidades aciculares. As medidas destas unidades coincidem também com os cristalitos de hidroxiapatita do osso de vertebrados (Millard e Pautard, 1958; Damask, 1978). Para medições mais precisas entretanto, seria necessário isolar individualmente os cristalitos, o que não foi conseguido até o momento.

Já é um fato bem conhecido que a síntese de hidroxiapatita está relacionada com a presença de fosfatase alcalina (Hayashi, 1995; Boyan et al., 1992), seja ligada somente à membrana como nos mamíferos, ou na membrana e no citoplasma de certas bactérias.

As fosfatases alcalinas são enzimas não específicas que hidrolisam virtualmente todos monoésteres de ácido fosfórico com a liberação de ortofosfato. Estas enzimas são ativas no lado alcalino de neutralidade, especialmente em pH 9,0 e acima. A localização ultra estrutural de atividade fosfatásica é baseada largamente na aplicação de procedimentos histoquímicos envolvendo a precipitação de sais metálicos. Estes métodos são baseados no princípio de que íons fosfato liberados pela hidrólise enzimática de vários fosfatos orgânicos, servem como substrato e são capturados no local de formação pelos cátions metálicos presentes no meio, para formar precipitados.

A fosfatase alcalina que hidrolisa muitos ésteres diferentes do ácido fosfórico é uma enzima com uma especificidade relativamente ampla, capaz de agir em inúmeros substratos diferentes relacionados estruturalmente, porém com velocidade de catálise bastante diversa (Lehninger, 1975). A função precisa representada por esta enzima permanece indefinida, mas apresenta ser um elemento crítico no processo da formação do osso (Sela et al., 1992).

Mayahara et al. (1967) introduziram o método de citrato de chumbo como reagente de captura, para demonstrar a atividade ultracitoquímica da fosfatase alcalina não específica a altos valores de pH (pH alcalino), em vários tecidos de vertebrados. A vantagem deste método é a possibilidade do uso direto do citrato de chumbo o qual pode permanecer solúvel em solução clara em intervalos altos de pH alcalino sem o uso simultâneo de um agente quelante.

Nossos experimentos demonstram a existência da enzima fosfatase alcalina entre os ossículos de *Spirostomum* tal como foi demonstrado por Wang et al. (1998) em osteoblastos. Além disto neste estudo, confirmamos por microanálise a região com reação positiva para a enzima, onde se precipitou o chumbo. Até o momento, o



chumbo não foi localizado com certeza, em nenhuma outra região em nossos experimentos. Apenas alguns vacúolos contendo material secretor mostraram indícios da presença da fosfatase alcalina em nossas preparações.

Verificamos portanto que existe uma participação da enzima fosfatase alcalina diretamente relacionada à formação do mineral.

É interessante notar que Padmavathi (1958) já havia detectado a presença de fosfatase alcalina no mesmo organismo, sem entretanto, correlacionar com qualquer evento biológico na célula. Mais tarde, experimentos de Jones (1967) tiveram resultados inconclusivos.

A microscopia eletrônica tem fornecido resultados de análises bioquímicas, morfológicas e fisiológicas esclarecendo as relações entre estrutura e função (Párducz, 1967). É extremamente útil, portanto, no estudo de cristais de dimensões diminutas (Fernandez-Moran, 1957; Millard e Pautard, 1958).

Estes cristais podem ter sido formados em *Spirostomum ambiguum* dentro de membranas, embora cristais não envolvidos por membranas também tenham sido observados por nós.

Nossos resultados com microanálise e difração eletrônica dos ossículos vieram confirmar que estes minerais são seguramente hidroxiapatita: a relação Ca/P é de 1,57(1) dentro da faixa 1,3 a 2,0 presente no osso de vertebrado (Guyton, 1977; Takagui e Silveira, 1999), e os diagramas de DEAS indicaram os mesmos espaçamentos cristalinos característicos da apatita de vertebrados, já identificados por Pautard (1959) por meio de raios-X.

Outro resultado coincidente é o comportamento dos ossículos do *Spirostomum ambiguum* em relação à aplicação do estímulo elétrico. Em nossos experimentos, verificamos que uma corrente de 80  $\mu$ A aplicada durante uma semana foi o suficiente para induzir o crescimento (ou acelerar a síntese) dos cristais, conforme aqui relatado. O acúmulo dos ossículos na célula assim tratada foi suficientemente alto para demonstrar o comportamento piezoelétrico do material. Este fenômeno é também uma característica de osso humano (Guyton, 1977; Damask, 1978; Shamos et al., 1963). A propriedade piezoelétrica é característica própria de cristais sem centro de simetria, como é o caso da hidroxiapatita.

A origem e o significado dos depósitos minerais neste organismo unicelular altamente contrátil deve ser ainda esclarecido e espera-se experimentos adicionais de especialistas de outras áreas.

Nossa interpretação é de que os sais de hidroxiapatita, que são altamente solúveis, possam ser usados no metabolismo da célula como fonte de cálcio e fósforo, e não seriam simplesmente um produto final de excreção, derivado talvez de mitocôndrias (Jones, 1967).

Para nossos estudos foi necessário desenvolver um método de isolamento para cultivo em laboratório em larga escala. A não ser para preparações de microtomia, todos os demais métodos não envolveram qualquer reagente químico. Para romper as células e isolar os ossículos usamos ultra-som.

A corrente elétrica aplicada no circuito, entre os 2 eletrodos possibilitou-nos também com grande eficácia a coleta dos protozoários já que *Spirostomum* se manteve em posição fixa (imóveis) enquanto que grande parte dos microorganismos migravam em direção ao eletrodo negativo (alguns em direção ao positivo), isto é, houve migração seletiva de microorganismos em direção aos eletrodos. Portanto, sem a utilização do circuito, a presença de milhares de microorganismos, nadando na cultura em todas as direções, dificultaria a coleta dos *Spirostomum*.

O *Spirostomum* tem sido estudado também como bio-indicador em testes de toxicidade (Nalecz-Jawecki et al., 1993; Dû-Delepierre et al., 1996).

Colônias de bactérias, fungos e levedos que se alimentam de amido apareceram em grande quantidade nas vasilhas de sub-cultivo proliferando assim o *Spirostomum ambiguum* que se alimentam destes organismos.

A sobrevivência não parecia ser influenciada significativamente pelo regime de luz ou temperatura. Os grãos de arroz integral, além de suprirem bem as bactérias que se alimentavam do amido, forneceram nutrientes suficientes para a sobrevivência por um longo período, não deixando a água muito turva.

O efeito piezoelétrico tem sido observado em vários tecidos biológicos, particularmente em ossos secos. Aschero e seu grupo verificaram a presença do efeito inverso (mudança dimensional sob aplicação de um campo elétrico) em amostras de ossos frescos (Aschero et al., 1966).

Wang et al. (1998) utilizaram culturas de células osteogênicas no estudo do metabolismo do osso sob estímulo de corrente contínua de  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  obtendo assim a proliferação e calcificação das células cultivadas *in vitro*. A concentração intracelular de íons livres de cálcio aumentou em média 2,3 vezes em relação ao nível original. Apesar do estímulo elétrico poder induzir o aumento de íons livres de cálcio intracelular

no citoplasma, não é conhecido se o aumento destes íons vem do meio extracelular ou a partir do retículo endoplasmático.

Em nossas experiências, através do circuito elétrico estável com corrente elétrica suficiente para não matar os organismos, pudemos analisar o comportamento piezoelétrico dos ossículos de *Spirostomum ambiguum*. Eletrodos de ouro, platina ou titânio seriam preferíveis a fim de evitar contaminação devido à oxidação.

A relação Ca/P é um valor bastante significativo no estudo da hidroxiapatita, sendo que nos vertebrados se situa no intervalo de 1,3 a 2,0 (Guyton, 1977) dependendo das condições físicas e químicas. Nos *Spirostomum* obtivemos a razão dentro desta faixa, demonstrado pela microanálise.

Randall (1956) observou em cortes ultra-finos, que o ectoplasma de *Spirostomum* continha 2 formas distintas de estruturas granulares frequentemente com cerca de 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Uma das formas continha muitas partículas, sem nenhuma evidência de uma membrana envolvente. A outra estrutura consistia de um núcleo denso multigranular envelopado por uma membrana bem formada, claramente separada da estrutura interna. Estas estruturas provavelmente poderiam ser os ossículos mais tarde isolados por Pautard (1959) como também agora em nosso laboratório. Neste intervalo de mais de 40 anos não se tem notícia de outros estudos sobre os cristais isolados do *Spirostomum ambiguum*.

Nossos resultados mostram hidroxiapatita nos depósitos cristalinos sempre presentes no *Spirostomum ambiguum*, acrescentando novas informações aos resultados originais de Pautard e outros investigadores.

## V. Conclusões

*Spirostomum ambiguum* revelou-se um material bastante interessante para o estudo da biomineralização, isto é, a síntese de material inorgânico estruturado por um sistema biológico.

- Neste trabalho, utilizamos métodos físicos para isolar e caracterizar as inclusões minerais, sem interferência de reagentes químicos.
- A metodologia que utilizamos para isolar os organismos para o sub-cultivo, bem como o isolamento dos ossículos foi prática e econômica.
- A análise da difração de área selecionada forneceu-nos diagramas típicos de hidroxiapatita para os ossículos.
- Nas imagens dos agregados (ossículos) isolados por ultra-som, sem a intervenção de qualquer reagente químico, tais como os utilizados para fixação, desidratação ou polimerização, obtivemos espectros de microanálise mostrando-nos os picos de cálcio, fósforo e outros elementos que são encontrados também em ossos de vertebrados.
- A aplicação de corrente elétrica pulsada ( $\sim 80 \mu\text{A}$ , durante uma semana) na sub-cultura, aumentou o número, quantidade e a forma dos agregados nos ossículos de hidroxiapatita, demonstrando portanto que os ossículos de *Spirostomum ambiguum* apresentam propriedade piezoelétrica.
- O estudo de preparações totais através da microscopia eletrônica de varredura, possibilitou acompanhar as mudanças morfológicas que ocorriam quando os organismos foram submetidos ao jejum, bem como, reconhecer a forma tri-dimensional dos agregados de hidroxiapatita. Esta mudança de forma estava relacionada também ao acúmulo de ossículos no organismo.
- A presença de fosfatase alcalina localizada nos ossículos de hidroxiapatita de *Spirostomum ambiguum* nos sugere a hipótese de que essa enzima está relacionada com a formação deste mineral no organismo, tal como ocorre em ossos de vertebrados.
- Podemos considerar que nossos resultados experimentais fornecem subsídio para estudos mais detalhados do processo contínuo de formação, crescimento e maturação de biominerais. Portanto sugerimos que *Spirostomum ambiguum* constitui um modelo simples de biomineralização.

## VI. Referências

- 1) Aschero, G., Gizdulich, P., Mango, F. and Romano, S.M., 1966. Converse Piezoelectric Effect Detected in Fresh Cow Femur Bone. *J. Biomechanics* **29** (9): 1169-1174.
- 2) Barnes, R.D., 1984. *Zoologia dos Invertebrados*. (Saunders College/Roca), 4<sup>th</sup> ed., Chap.2.
- 3) Best, J.B., 1959. Some theoretical considerations concerning crystals with relevance to the physical properties of bone. *Biochim. Biophys. Acta* **32**: 194-203.
- 4) Bick, H., 1972. Ciliated protozoa – an illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology. Health Organization Geneva: 152-155.
- 5) Bien, S.M. and Preston, F.B., 1968. Calcification of *Spirostomum ambiguum*. *J. Protozool.* **15** (2): 251-256.
- 6) Boyan, B.D., Swain, L.D., Everett, M.M. and Schwartz, Z., 1992. Mechanisms of microbial mineralization. *Calcification in Biological Systems* (E.Bonucci, ed.) CRC Press **7**: 129-156.
- 7) Clark, A.M., 1945. The reactions of isolated parts of *Spirostomum*. *J. Exp. Biol.* **22**: 88-94.
- 8) Damask, A.C., 1978. *Medical Physics* (Academic Press, New York,), Chap.5, 121-146.
- 9) Dû-Delepierre, A.L., Persoone, G. and Grolière, C.A., 1996. A new low cost microbiotest with the freshwater ciliate protozoan *Spirostomum ambiguum*. *Hydrobiologia* **325**: 121-130.

- 10) Ettienne, E.M., 1970. Control of contractility in *Spirostomum* by dissociated calcium ions. *J. Gen. Physiol.* **56**: 168-179.
- 11) Ettienne, E.M. and Selitsky, M., 1974. The antagonistic effects of antimitotic agents on contraction and re-extension in the ciliate *Spirostomum ambiguum*. *J. Cell. Sci.* **16**: 377-383.
- 12) Fernandez-Morán, H., 1957. Electron microscopy and X-ray diffraction of bone. *Biochim. Biophys. Acta* **23**: 260-263.
- 13) Finley, H.E., 1951. Electron microscopy of thin-sectioned *Spirostomum*. *Science* **113** (2935): 362-363.
- 14) Guyton, A.C. 1977. *Tratado de Fisiologia Médica* (Interamericana, Rio de Janeiro,) 5th ed. Chap.79, 927-972.
- 15) Hamilton, T.C., Thompson, J.M. and Eisenstein, E.M., 1974. Quantitative analysis of ciliary and contractile responses during habituation training in *Spirostomum ambiguum*. *Behavioral Biology* **12** (3212R): 393-407.
- 16) Hamilton, T.C. and Osborn D., 1976. Measurements of contraction latencies to mechanical and electrical stimulation of the protozoan *Spirostomum ambiguum*. *J. Cell. Physiol.* **91**: 403-408.
- 17) Hawkes, R.B. and Holberton, D.V., 1974. Myonemal contraction of *Spirostomum*- Kinetics of contraction and relaxation. *J. Cell. Physiol.* **84**: 225-235.
- 18) Hayashi, Y., 1995. High resolution electron microscopy of enamel crystallites demineralized by initial dental caries. *Scann. Micr.* **9**(1): 199-206.
- 19) Hendricks, S.B., Jefferson, M.E. and Mosley, V.M., 1932. The Crystal Structures of Some Natural and Synthetic Apatite-Like Substances. *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD – Reference Code 24240), **81**: 352-369.
- 20) Ikeda, T., 1996. *Fundamentals of Piezoelectricity* (Oxford University Press, Oxford).



- 21) Ishida, M., Suzaki, T., Shigenaka, Y. and Sugiyama, M., 1992. Ultrastructure and calcium-dependent contraction of the myonemal network in a heterotrich ciliate, *Blepharisma-japonicum*. *European Journal of Protistology* **28** (3): 279-287.
- 22) Ishida, H., Suzaki, T. and Shigenaka, Y., 1996. Effect of Mg<sup>2+</sup> on Ca<sup>2+</sup> dependent contraction of a *Spirostomum* cell model. *European Journal of Protistology* **32** (3): 316-319.
- 23) Jones, A.R., 1966. Uptake of 45-calcium by *Spirostomum ambiguum*. *J. Protozool.* **13** (3): 422-428.
- 24) Jones, A.R., 1967. Calcium and phosphorus accumulation in *Spirostomum ambiguum*. *J. Protozool.* **14** (2): 220-225.
- 25) Kraus, W and Nolze, G., 1996. Powder Cell Program 2.01. *J. Appl. Cryst.* **29**: 301-303.
- 26) Lehman, W.J. and Rebhun, L.I., 1971. The structural elements responsible for contraction in the ciliate *Spirostomum*. *Protoplasma* **72**: 153-178.
- 27) Lehninger, A.L., 1975. *Bioquímica*. (Edgard Blucher Ltda).
- 28) Mann, S., Skarnulis, J. and Williams, R.J.P., 1981. Inorganic and Bio-inorganic chemistry in vesicles. *Isr. J. Chem.* **21**: 3-7.
- 29) Mann, S and Weiner S., 1999. Biomineralization: structural questions at all length scales. *J. Struct. Biol.* **126**: 179-181.
- 30) Mayahara, H., Hirano H., Saito, T. and Ogawa, K., 1967. The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* **11**: 88-96.
- 31) Millard, A. and Pautard, F.G.E., 1958. EM observations on apatite crystallites in human dentine and enamel. 4<sup>th</sup> Int. Congr. EM, Berlin Proceedings I: 357-360.



- 32) Nalecz-Jawecki, G., Demkowicz, K. and Sawicki, J., 1993. Protozoan *Spirostomum ambiguum* as a highly sensitive bioindicator for rapid and easy determination of water quality. *The Science of the Total Environment* (suppl): 1227-1234.
- 33) Ohara, R.Y. and Shigenaka, Y., 1985. Twisting contraction mechanism of a heterotrichous ciliate, *Spirostomum ambiguum*-Role of the myoneme. *Cytobios* **44**: 7-17.
- 34) Osborn, D. and Hamilton, T.C., 1977. Electron microbeam analysis of calcium distribution in the ciliated protozoan, *Spirostomum ambiguum*. *J. Cell. Physiol.* **91**: 409-416.
- 35) Padmavathi, P.B., 1958. Histochemical evidence for the presence of phosphatase activity in *Spirostomum ambiguum*. *Naturwin* **45**: 553.
- 36) Párducz, B., 1967. Ciliary movement and coordination in ciliates. *Int. Rev. Cytol.* **21**: 91-128.
- 37) Pautard, F.G.E., 1959. Hydroxyapatite as a developmental feature of *Spirostomum ambiguum*. *Biochim. Biophys. Acta* **35**: 33-46.
- 38) Pautard, F.G.E., 1960. Calcification in unicellular organisms. *Calcification in Biological Systems* **5**:1-14.
- 39) Pautard, F.G.E. and Williams, R.J.P., 1982. Biological minerals. *Chemistry in Britain* **18** (3): 188-193.
- 40) Randall, J.T., 1956. Fine structure of some ciliate protozoa. *Nature* **178** (4523): 9-14.
- 41) Salgueiro, L. e Ferreira, J.G., 1991. Introdução à Biofísica. (Fund. C. Gulbenkian/Lisboa). Cap. 6.

- 42) Sela, J., Schwartz, Z., Swain, L.D., and Boyan, B.D., 1992. The role of matrix vesicles in calcification. *Calcification in Biological Systems* (E. Bonucci, ed.) CRC Press **5**: 73-105.
- 43) Shamos, M.H., Lavine, L.S. and Shamos, M.I., 1963. Piezoelectric effect in bone. *Nature*, **5**: 81.
- 44) Sleigh, M.A., 1973. *The Biology of Protozoa*. (Edward Arnold Limited/London).
- 45) Sleigh, M.A., 1974. *Cilia and Flagella*. (Academic Press/London). Chap. 2.
- 46) Takagui, R.R. and Silveira, M., 1999. Studies of the ossicles from the ciliate protozoan *Spirostomum ambiguum*. *Japn. J. Appl. Phys.* **38**(9A): 5303-5304.
- 47) Tamm, S.L. and Tamm, S., 1981. Ciliary reversal without rotation of axonemal structures in *Ctenophore* Comb plates. *The Journal of Cell Biology* **89**: 495-509.
- 48) Wang, Q., Zhong, S., Ouyang, J., Jiang, L., Zhang, Z., Xie, Y. and Luo, S., 1998. Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **348**: 259-268.
- 49) Weast, R.C., 1974-1975. Ed. *Handbook of Chemistry and Physics* (CRC Press, Cleveland), 55th ed., B218.
- 50) Weiner, S. and Addadi, L., 1997. Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater Chem.* **7** (5): 689-702.