UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)

ESTUDO DA AÇÃO DA DEXAMETASONA NA REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL DO PEIXE TELEÓSTEO *Cyprinus carpio* (carpa)

Autora: Beatriz Silva Ochandio
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi
Co-orientadora: Profa. Dra. Ivanira José Bechara

Rio Claro - SP
Agosto - 2010

BEATRIZ SILVA OCHANDIO

ESTUDO DA AÇÃO DA DEXAMETASONA NA REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL DO PEIXE TELEÓSTEO *Cyprinus carpio* (carpa)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi
Co-orientador: Profa. Dra. Ivanira José Bechara

Rio Claro
2010

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estudo da ação da Dexametasona na regeneração da nadadeira caudal do peixe Teleósteo Cyprinus carpio (carpa)

AUTORA: BEATRIZ SILVA OCHANDIO

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
ORIENTADORA: Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. IVANIRA JOSÉ BECHARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. IVANIRA JOSÉ BECHARA ,
Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. LUCIA ELVIRA ALVARES
Departamento de Histologia e Embriologia - Instituto de Biologia - Unicamp

Data da realização: 03 de agosto de 2010.

“Se eu sou tudo o que eu sei, é porque em mim há um pouquinho de cada um que me ensinou.”

“Todo meu patrimônio são meus amigos!!”

(Emily Dickinson)

Aos meus pais, minha irmã e minha avó, **Roberto Mariano Ochandio**, **Elisabete da Silva Ochandio, Gabriela Silva Ochandio e Hercília Gaburro Ochandio**.

Obrigada pela vida que me proporcionam, pelo amor e carinho incondicional que me dedicam e pela educação e oportunidade de realizar mais esse importante momento em minha vida.

A TODA minha família agradeço os ensinamentos, companheirismo e união familiar proporcionada em mais esses dois anos. E principalmente, digo obrigada as amizades e alegrias que recebo constantemente dos meus queridos primos. Em especial ao Pedro que, apesar de ter nos deixado na véspera de minha prova, pela nota que consegui, tenho certeza que estava presente quando a prestei e entrei com êxito para o mestrado.

A Tata (Maria Aparecida Xavier) que cuida de mim todos os dias, e TODOS Meus Meninos e Minhas Meninas que também estão sempre ao meu lado e a cada dia me demonstram mais o quanto me amam.

Em especial agradeço as amigas Tatiana Carvalho, Jaqueline de Bem e Silvana Poiani por durante esse período me proporcionarem teto e amizade incondicionais!

Agradecimentos

São tantos os agradecimentos e as pessoas que tenho que agradecer que tenho medo de esquecer algum ou de alguém.

Agradeço, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus Rio Claro por possibilitar a realização do meu mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a minha orientadora Profa Dra Patricia Pasquali Parise Maltempi, pela oportunidade, incentivo, carinho e aprendizado.

À minha coorientadora Profa Dra Ivanira José Bechara, obrigada pela orientação, pela amizade, pela paciência em passar seus ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pelo carinho e incentivo durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti pela compreensão, atenção e disponibilidade.

Aos professores da banca examinadora pela gentileza da participação e pelas correções necessárias.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UNESP do Campus de Rio Claro, em especial a Rosemary D. Oliveira S. Cardoso, pela constante ajuda, disponibilidade e incentivo para a realização da pesquisa.

Aos amigos e funcionários, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP – UNICAMP, D. Raquel, Rita, Juvani, D. Neuzinha, Célia, Cláudia, Junia, Patrícia, Petra, Carla, Carol, Karina, Eliana, Renata, Denner, Silvio, Débora, Lucimara, Camila e Ricardo; e amigos e funcionários do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, em especial o Gerson, a Mônika e o Antônio, obrigada pela convivência e troca de alegrias.

Ao Baltazar Pereira de Paula, à Cleusa de Oliveira Franco e ao Patrick Vianna Garcia pela colaboração, apoio e incentivo para a realização deste trabalho, além dos bons momentos de descontração.

Agradeço às pessoas com quem convivi no Laboratório de Bioensaios em Peixes do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pela troca de conhecimentos, bons momentos e convivência harmoniosa.

A todos na UNESP que souberam me incentivar em especial a Profa Dalva Maria B. Bonotto pelos ensinamentos, paciência e amizade transmitidos durante o estágio docência em Prática de ensino em Ciências e Biologia: Estágio Supervisionado.

A Profa Dra Maria do Carmo Alberto Rincón, por me abrir o mundo acadêmico, e com seu carinho, companheirismo e ensinamentos me ser tão amiga e mãe.

Aos amigos: Mariana Peterlini, Paula Paiva, Aline Tagliaferro e Rodrigo Castanha, pelos momentos de alegria que tivemos no laboratório e fora deste. Obrigada pela recepção no laboratório e pela amizade construída. Amo vocês!

As amigas, Débora Pereira, Alessandra Moraes, Stella Carvalho, Michelle Klein, Paula Sanches e principalmente Flávia Calais, pelo companheirismo, momentos de risadas e por estarem sempre me apoiando e me incentivando.

Agradeço a todos meus queridos amigos e colegas da graduação e pós-graduação da UNICAMP-Campinas e UNESP- Rio Claro, pelo carinho com que sempre me acolheram nos Departamentos. E a Danielli Giratto e Letícia Hebling, obrigada pela paciência, atenção e amizade especial!

Especialmente muito obrigada também aos peixes que tiveram suas nadadeiras amputadas para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....9
ABSTRACT.....10
1 INTRODUÇÃO.....11
1.1 A estrutura da nadadeira dos peixes teleósteos.....11
1.2 A regeneração das nadadeiras dos teleósteos.....13
1.3 Carpa…….....17
1.4 Dexametasona.....18
2 OBJETIVO.....21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....22
3.1 Material.....22
3.2 Métodos.....22
3.2.1 Montagem dos aquários.....22
3.2.2 Preparação das amostras para microscopia de luz.....24
3.2.2.1 Técnica de coloração pela hematoxilina e eosina (H.E.).....24
3.2.2.2 Técnica de coloração pelo tricrômico de Masson.....25
3.2.2.3 Técnica de coloração pelo picrosirios-hematoxilina.....25
3.3 Análise Estatística.....26
4 RESULTADOS.....29
5 DISCUSSÃO 47
6 CONCLUSÕES.....52
7 REFERÊNCIAS.....53

Resumo

As nadadeiras dos peixes teleósteos apresentam uma capacidade de regeneração bastante rápida, o que as torna um modelo biológico importante e adequado para o estudo *in vivo*. Estudos mostram que corticóides usados por longos períodos podem atrasar o processo de cicatrização, influenciando na reepitelização, na neovascularização e na síntese do colágeno. Os constituintes das nadadeiras dos peixes teleósteos contêm grande quantidade de colágeno e assim o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da dexametasona (um antiinflamatório e glicocorticóide esteróide bastante utilizado no tratamento de doenças reumáticas) durante o processo regenerativo das nadadeiras caudais das carpas (*Cyprinus carpio*). Para isso, foram montados dois aquários de vidro, um para o grupo controle e outro para o grupo tratado com a dexametasona (Henrifarma) na concentração de 20mg/L. Os peixes distribuídos nesses aquários tiveram suas nadadeiras caudais amputadas transversalmente e permaneceram nos respectivos aquários para que ocorresse a regeneração. Foram feitas coletas das nadadeiras em regeneração em intervalos de um, dois, quatro, seis, oito e 10 dias após a amputação. As amostras foram processadas histologicamente para permitir os estudos ao microscópio de luz e a análise estatística. Observou-se que nos peixes do grupo controle, as nadadeiras regeneraram normalmente e cresceram o esperado em cada intervalo de tempo. Nos peixes do grupo tratado com dexametasona, no entanto, a regeneração das nadadeiras caudais foi mais lenta. Verificou-se que, em cada intervalo analisado, as nadadeiras regeneradas dos peixes expostos à droga eram menores que a medida das nadadeiras dos peixes do grupo controle, provavelmente porque a dexametasona tenha influenciado a expressão dos genes necessários para o processo de regeneração. Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que nessa concentração de dexametasona, ocorre um atraso no processo, mas não a total inibição da regeneração. Dessa forma, os resultados obtidos comprovam que a nadadeira caudal é um bom modelo para estudos histológicos sobre a regeneração e a ação da toxicidade de drogas, mas, também, que é necessário um estudo aprofundado a respeito do processo regenerativo molecular. Para se conhecer e compreender melhor todas as alterações em todas as fases é de grande importância a interação entre os estudos de biologia celular e molecular nesse processo.

Palavras-chave: Teleósteo. Nadadeira. Regeneração. Dexametasona.

Abstract

The fins of teleost fish have a capacity for rapid regeneration, which makes them a suitable biological model for *in vivo* investigation. Studies have shown that, when used over long periods, corticoids may slow down the healing process, thereby influencing re-epithelialization, neovascularization and collagen synthesis. As the fins of teleost fish contain a large amount of collagen, the aim of the present study was to investigate the effect of dexamethasone (an anti-inflammatory steroid glycocorticoid often used in the treatment of rheumatic diseases) during the regeneration process of the caudal fin of the carp (*Cyprinus carpio*). Two glass aquaria were used for each regeneration interval - one for the control group and another for the group treated with dexamethasone (Henrifarma) at a concentration of 20 mg/L. The caudal fins were amputated transversely and the fish remained in their respective aquaria until regeneration had occurred. Collections of regenerating fin tissue were performed at one, two, four, six, eight and ten days following amputation. The samples were processed for light microscopy and statistical analysis. The fins in the control group regenerated normally and grew at the expected rate in each time interval. The fins in the group treated with dexamethasone regenerated at a slower rate at each time interval. It is possible that dexamethasone affected the expression of the genes needed for the regeneration process. The results of the present study demonstrate delayed regeneration with dexamethasone at the concentration used, but not total inhibition of the process. Thus, the caudal fin proved to be a good model for the histological investigation of tissue regeneration and the toxic effect of this drug on this process. In order to gain a better understanding of the alterations in all phases of the regeneration process, histological analysis should be combined with a molecular analysis of this process.

Keywords: Teleost. Fin. Regeneration. Dexamethasone.

1 Introdução

1.1 *A estrutura da nadadeira dos peixes teleósteos*

Trabalhos como os de Goodrich, 1904; Prenant, 1936; Blanc, 1947; Grassé, 1958; Lanzing, 1976; Becerra et al., 1983, mostraram que não existem diferenças morfológicas e celulares fundamentais entre as nadadeiras de um mesmo peixe, ou seja, entre a nadadeira dorsal, peitoral, pélvica, anal e caudal. Essas estruturas dos peixes teleósteos, em geral, possuem anatomia relativamente simples.

Na maioria dos teleósteos, as nadadeiras consistem principalmente de elementos esqueléticos, os raios da nadadeira, cobertos pela pele. Esses raios originam-se da base da nadadeira e se estendem distalmente, ramificando-se dicotomicamente em direção à margem (ARITA, 1971), com exceção do raio lateral da nadadeira caudal que não sofre bifurcação (AKIMENKO et al., 2003). Cada raio mole (articulado) é conhecido como uma **lepidotriquia**. Cada lepidotriquia é constituída por um par de estruturas alongadas e curvas dispostas bilateralmente: os demirraios, que são subdivididos longitudinalmente em hemissegmentos lepidotriquiais, separados pelas articulações (ARITA, 1971). Dois hemissegmentos bilaterais circundam uma região intrassegmentar onde se encontram feixes nervosos, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo frouxo. Esses hemissegmentos são mantidos no lugar através de ligamentos de colágeno (BECERRA et al., 1983) (Fig. 1).

O tecido que constitui as lepidotriquias já recebeu vários nomes como: “osso típico” (GOODRICH, 1904; BOUVET, 1974), “osso dérmico” (GOSS; STAGG, 1957; KEMP; PARK, 1970), “osso acelular” (MOSS, 1963) e “tecido osteóide” (BLANC, 1947). No entanto, Montes et al. (1982) demonstraram, através de estudos mais detalhados, que os raios das nadadeiras possuem, na verdade, todas as características morfológicas e histoquímicas de tecido cartilaginoso e não ósseo. Ontogeneticamente, a lepidotriquia tem uma origem dermal e é inicialmente sintetizada na interface dermo-epidermal (SANTAMARÍA et al., 1992).

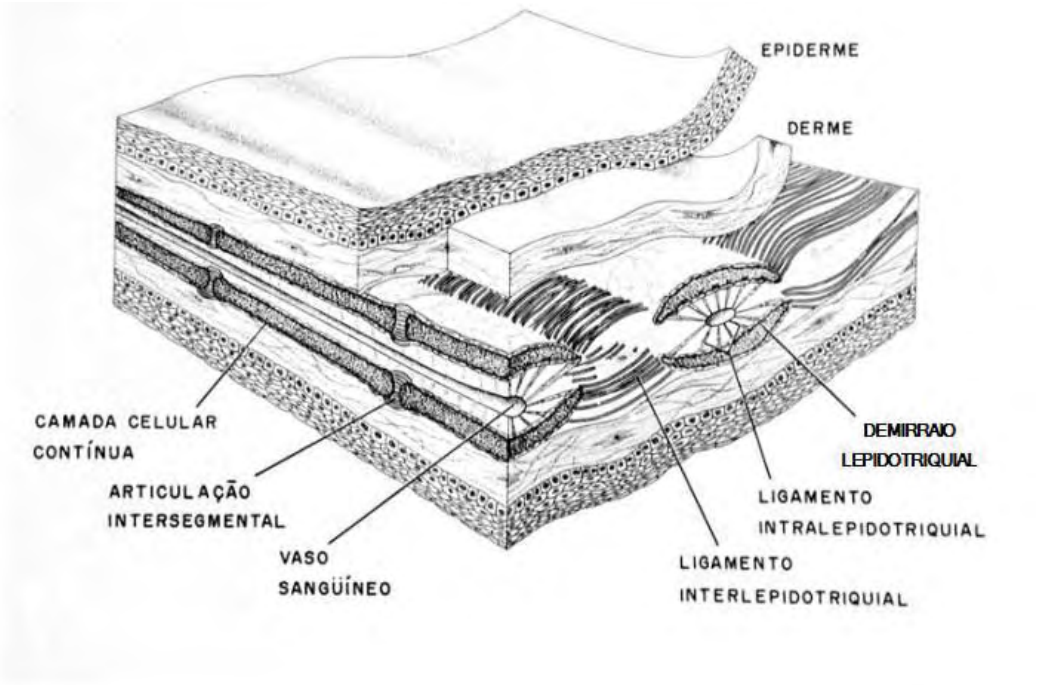


Figura 1: Reconstrução tridimensional da estrutura geral da nadadeira caudal de teleósteo (modificado de BECERRA et al., 1983).

Estendendo-se da porção distal de cada lepidotriquia em direção à margem da nadadeira, há um conglomerado de espículas pequenas e delgadas chamadas **actinotriquias**, que sustentam a borda da membrana da nadadeira (BECERRA et al., 1983) (Fig. 2).

As actinotriquias são macrofibrilas hiperpolimerizadas, compostas de uma proteína característica semelhante ao colágeno, denominada elastoidina (KRUKENBERG, 1985). A semelhança entre esses dois componentes está no padrão de estriação transversal da elastoidina parecida com a do colágeno, quando observada ao microscópio eletrônico de transmissão. A diferença é que a elastoidina não forma gelatina pelo cozimento, como ocorre com o colágeno. Análises bioquímicas revelaram duas frações diferentes na elastoidina: uma colagênica (presença de glicina, prolina e hidroxiprolina) e outra não colagênica (rica em tirosina), que conferem alta capacidade de polimerização a esta proteína (GROSS; DUMSHA, 1958).

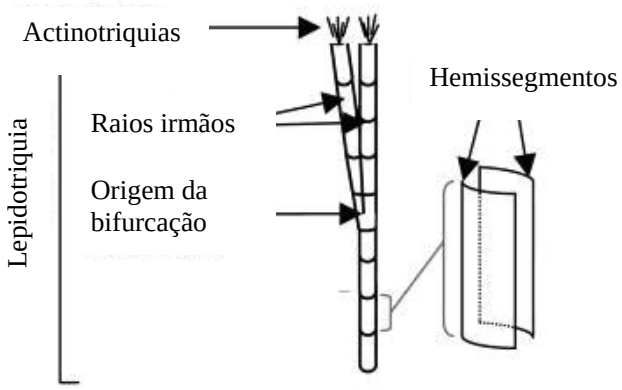


Figura 2: Representação das unidades esqueléticas da nadadeira caudal de teleósteo que apresenta as actinotriquias (modificado de AKIMENKO et al., 2003).

1.2 *A regeneração das nadadeiras dos teleósteos*

A capacidade de manter a morfologia e função de vários tecidos é que proporciona longevidade para muitos organismos multicelulares. Algumas espécies de invertebrados, como hidras, planárias, e anelídeos, podem regenerar partes de seu corpo inteiro a partir de um pequeno pedaço de tecido (GLILIOT, 2006; SÁNCHEZ, 2007; YOSHINARI, 2009). E a compreensão do desenvolvimento desse processo é importante para melhor se conhecer a biologia desses animais (ABELOOS, 1932; GOSS; STAGG, 1957; KIORTSIS; TRAMPUSCH, 1965; HAY, 1966; MATTSON, 1976; ORD; STOCKEN, 1984; MUNEOKA; BRYANT, 1984; MUNEOKA et al., 1986; GERAUDIE et al., 1995).

Algumas espécies de vertebrados como anfíbios e peixes teleósteos tem a habilidade de regeneração mantida e o processo da reconstituição das nadadeiras recupera a função desse apêndice se lesionado (YOSHINARI, 2009).

A regeneração dos apêndices de vertebrados tem sido bem estudada na cauda de anfíbios (WALLACE, 1981). Quando, por exemplo, um membro de uma salamandra é amputado, as células adjacentes ao ferimento dividem-se rapidamente e cobrem o coto. A proliferação de células epiteliais prossegue e as células empilham-se até o ápice, formando um revestimento apical. As células do tecido conjuntivo do coto (fibroblastos, miócitos e osteócitos) dividem-se e as células mesenquimais originam o blastema e iniciam uma rápida multiplicação. As células endoteliais proliferam e vascularizam o blastema, ocorrendo uma diferenciação ordenada em osso, músculo, tendão, arteríolas, capilares e vênulas. O resultado final é a reposição precisa do membro perdido (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1988).

Esse mecanismo complexo de regeneração axial é provavelmente controlado pela informação genética contida nas células do coto; a amputação desencadeia a expressão desta informação, a qual é reprimida após o desenvolvimento embrionário. Em mamíferos, o tecido de granulação, que substitui o tecido perdido, é reminiscente do blastema de anfíbios. Entretanto, em vez de formar um membro, o tecido de granulação amadurece apenas em tecido conjuntivo denso e, eventualmente, em uma cicatriz (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1988).

A regeneração das nadadeiras dos teleósteos envolve eventos semelhantes aos observados em anfíbios e tem início já nas primeiras horas após uma lesão (MURCIANO et al., 2007). Existem na literatura numerosos trabalhos que relatam o desenvolvimento e o estudo histológico dessa regeneração das nadadeiras dos teleósteos (NABRIT, 1929; GARRAULT, 1936; PRENANT, 1938; BLANC, 1949; GOSS; STAGG, 1957; KEMP; PARK, 1970; BOUVET, 1974; GERAUDIE, 1977, 1978; WEIS; WEIS, 1980; SANTAMARÍA et al., 1992; GERAUDIE et al., 1995; BECERRA et al., 1996; BÖCKELMANN; BECHARA, 2004, 2007; BÖCKELMANN et al., 2010).

As fases fundamentais do processo de regeneração das nadadeiras são: cicatrização, a partir da formação de uma capa epidermal apical, formação de uma massa de células mesenquimais chamada blastema, diferenciação dessas células, síntese e deposição de matriz extracelular, crescimento e restauração morfológica (GOSS; STAGG, 1957; Becerra et al., 1996; BÖCKELMANN et al., 2010).

Após a amputação, o tecido conjuntivo presente dentro do raio é selado por um coágulo com numerosas células sanguíneas, principalmente leucócitos, e enquanto isso, células da epiderme lateral migram em direção ao plano de amputação para fechar a ferida. Um dia depois da amputação, a ferida já se encontra completamente fechada (Fig. 3). Durante os 2 ou 3 dias seguintes, células mesenquimais formam o blastema (Fig. 3), que é invadido por terminações nervosas, que são presença decisiva para a síntese de proteínas (GOSS; STAGG, 1957; GERAUDIE; SINGER, 1979 a e b; GERAUDIE; SINGER, 1985; SANTOS-RUIZ et al., 2002).

A formação de uma massa de células que é modelada nas estruturas perdidas com a amputação, faz do blastema um dos modelos de biologia regenerativa mais estudados. Muitos estudos baseiam-se em identificar a eficiência e a perfeição da restauração de um tecido tridimensional tão complexo na regeneração das caudas (YIN; POSS, 2008).

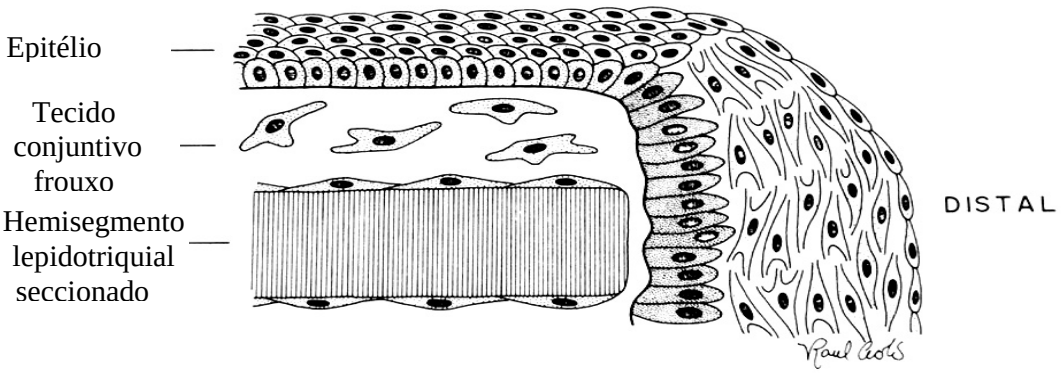
Durante a formação do blastema, a camada basal da epiderme da nadadeira, composta de células cubóides, se dispõem de maneira adjacente ao tecido blastemal, sendo separadas apenas pela presença da lâmina basal (POSS et al., 2003) (Fig. 3).

As células do blastema, de morfologia homogênea, começam sua diferenciação aderindo à lâmina basal da epiderme e iniciando a síntese das lepidotriquias (Fig. 3). Por volta do quinto dia, inicia-se a segmentação e, aproximadamente no sétimo dia, os raios já se bifurcaram.

A nadadeira cresce no sentido próximo-distal e no período entre duas a três semanas após a amputação atinge o tamanho e a forma que apresentava antes. Assim, essa rápida regeneração permite que as nadadeiras sejam usadas como modelo biológico bastante apropriado para o estudo do crescimento dos tecidos conjuntivos (BECERRA et al., 1996).

As actinotriquias aparecem pela primeira vez na matriz do tecido conjuntivo adjacente à epiderme, aproximadamente no quinto dia de regeneração, encontrando-se rodeadas parcial ou totalmente pelos fibroblastos (Fig. 3). O tamanho e a distribuição final do ramalhete de actinotriquias são alcançados quase no décimo dia, mantendo-se em posição distal durante todo o processo (MARÍ-BEFA et al., 1989; BECERRA et al., 1996).

1º dia de regeneração



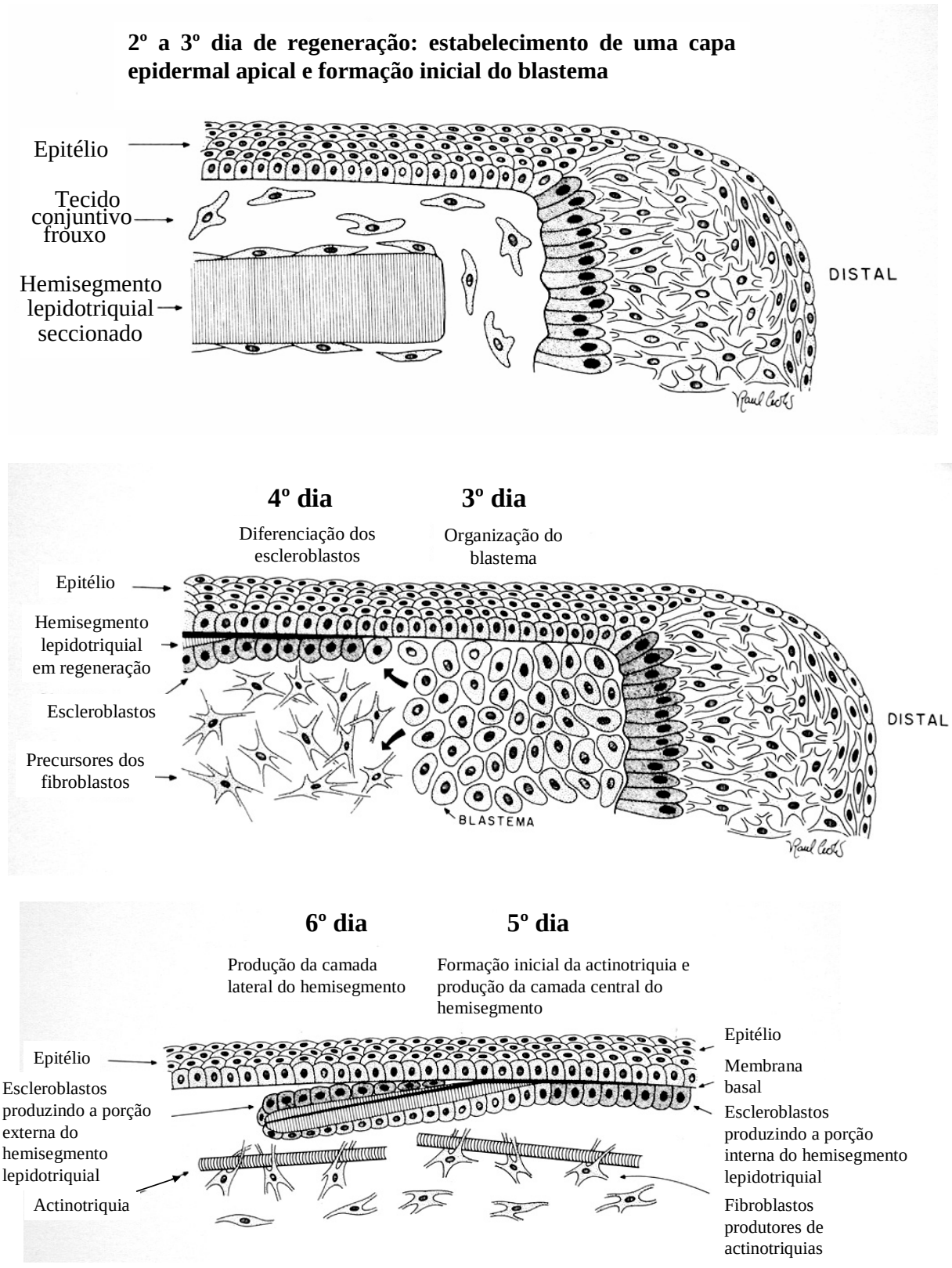


Figura 3: Diagrama ilustrando a seqüência de eventos envolvidos na regeneração dos raios da nadadeira de teleósteos. A regeneração ocorre após excisão parcial da nadadeira (modificado de BÖCKELMANN, 2003).

A anatomia relativamente simples e os tecidos comuns aos membros de tetrápodos fazem da nadadeira caudal dos teleósteos um órgão vantajoso para estudo. E Bechara et al. (2000) propuseram que, a dexametasona pode afetar a síntese e a organização das moléculas de colágeno na regeneração das nadadeiras dos peixes teleósteos, pois os constituintes esqueléticos das nadadeiras (as lepidotriquias), bem como todo o tecido conjuntivo intralepidotriquial, contém grande quantidade de colágeno.

Dessa forma, nessa pesquisa, foi utilizada a espécie *Cyprinus carpio* que possui uma capacidade excepcional para regenerar todos os tipos de nadadeiras.

1.3 *Carpa*

Os peixes são utilizados freqüentemente como modelo para estudos experimentais por oferecerem algumas vantagens como: apresentar grande número de descendentes a partir de uma mesma desova; ter dieta controlada assim que passam a aceitar ração; e possibilitar várias vias de administração química, como por exemplo, injeções, acréscimo à ração, ou pela adição à própria água do tanque.

A carpa (*Cyprinus carpio*) (Fig. 4) é um peixe ósseo, de águas doces, caracterizada por apresentar corpo tubular, com a parte dianteira alongada e nadadeiras com raios. Das costas ao ventre, a carpa é mais “alta” que muitas espécies, revelando não ser rápida nadadora (PARKER, 1990).

É um peixe integrante da família dos ciprinídeos, originário da Ásia e foi introduzido em todos os continentes pela piscicultura de consumo. É cultivado tanto nas áreas temperadas como nas áreas subtropicais e tropicais (AZEVEDO; FROTA-PESSOA, 1981).

Possui escamas grandes, nadadeira dorsal longa com cerca de 20 raios e duas barbelas ou bigodes de cada lado da boca conhecidos como barbilhões (cerdas carnosas, sensível ao toque) (Fig. 4) (ORR, 1986; PARKER, 1990). As nadadeiras dorsal e anal dão estabilidade e a caudal, para a maioria das espécies, aumenta a mobilidade e velocidade, serve para impulsionar o peixe para frente, além de nadadeiras peitorais e pélvicas aos pares que também é o que permite uma natação rápida (HICKMAN et al., 2004).

A carpa tem nadadeira caudal bilobada (Fig. 4) (PARKER, 1990), possui boca grande e propaga-se com bom êxito em águas paradas. Não têm dentes no interior da

boca, mas possui maxilas faringianas (uma garganta que mastiga) (PARKER, 1990; HICKMAN et al., 2004). Sua comida natural quando adulta são animais de fundo e beira de lagos como vermes, moluscos e larvas de insetos, mas consome bem ração. (WOYNAROVICH, 1988; PARKER, 1990).

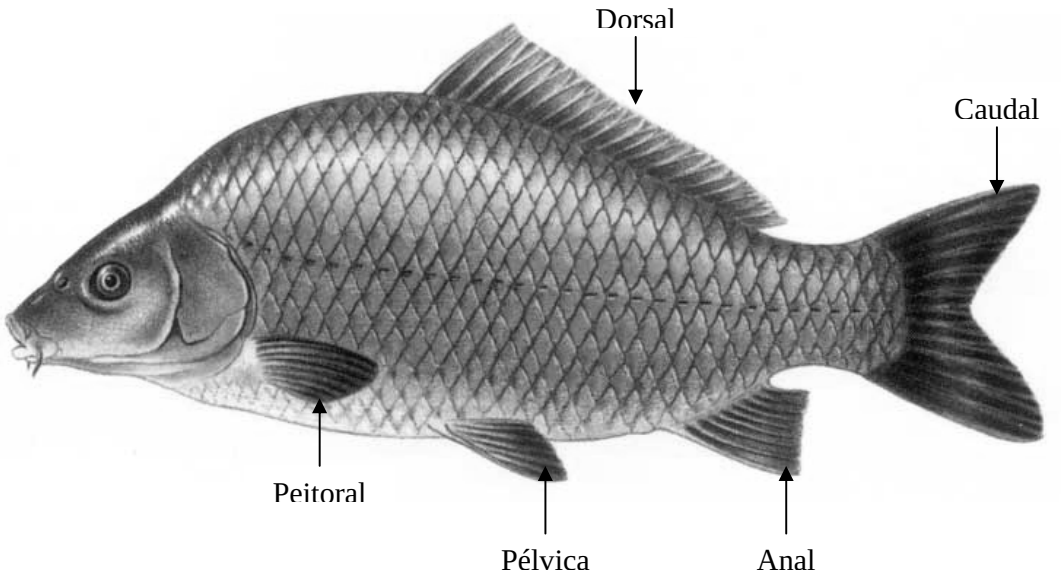


Figura 4: Representante de uma carpa mostrando a localização de suas nadadeiras (Dorsal, Peitoral, Pélvica, Anal e Caudal) (www.peixariarainhadestoamaro.com.br/).

1.4 *Dexametasona*

A dexametasona, pó branco de aspecto cristalino e pouco solúvel em água, é um glicocorticóide esteróide bastante utilizado na terapia de doenças degenerativas do colágeno, como as doenças reumáticas, além de constituir um medicamento que previne processos inflamatórios de várias naturezas (REYNOLDS, 1996; FERREIRA, 1999).

Acredita-se que os corticóides iniciam sua ação pela ligação a proteínas receptoras específicas nas células dos tecidos alvos (BAULIEU, 1975; EDELMAN, 1975; LIAO, 1975; BAXTER, 1976). Entretanto alguns autores descrevem que se usados por longos períodos, os corticóides podem atrasar o processo de cicatrização, influenciando na reepitelização, na neovascularização e na síntese do colágeno (GUPTA et al., 1999; TALAS et al., 2002).

Os corticóides podem, também, induzir destruição progressiva. Esse efeito pode ser medido através de estudos sobre a influência hormonal direta nos condrócitos, o constituinte celular da cartilagem (SU et al., 1996; MIYAZAKI et al., 2000). Esses

autores observaram que a dexametasona reduziu a atividade do fator beta de crescimento (TGF beta) dos condrócitos e a expressão do RNAm para o colágeno tipo II, em cultura de condrócitos articulares de rato.

Após a publicação de trabalhos mostrando a relação de corticóides com o colágeno, esses componentes passaram a ser alvo de muitos estudos, devido à sua capacidade de inibir a produção de colágeno (CUTRONEO et al., 1981; SILBERMANN et al., 1987; ADVANI et al., 1997).

Alguns trabalhos mostraram que injeções diárias múltiplas de cortisona em ratos jovens, apesar de não diminuir o “pool” de colágeno maduro, diminuem o conteúdo de colágeno recém-sintetizado da pele (KIVIRIKKO; LAITINEN, 1965; SMITH, 1967).

Em seus experimentos utilizando ratos, Oishi et al. (2002) observaram que a dexametasona interferiu fortemente na síntese e na degradação dos colágenos tipo I e III na pele dorsal dos animais que receberam uma dose diária de 1 mg/kg de dexametasona durante oito dias, provocando uma atrofia da pele. Em outro estudo relacionado, Beer et al. (2000) notaram a ação da dexametasona na expressão de várias moléculas reguladoras da cicatrização de feridas na pele e observaram um efeito inibitório na expressão de citocinas, fatores de crescimento, enzimas e moléculas da matriz extracelular da pele.

Resultados de estudos *in vivo* e com cultura de células de condrosarcoma humano (OUMS-27) tratados com várias doses de dexametasona sugerem que a dexametasona causa uma inibição do crescimento dessas células através da inibição da tradução do RNAm para o colágeno tipo II, cuja quantificação foi mais baixa que nos controles, causando um efeito inibitório na proliferação das células do tumor (KAWASHIMA et al., 2003).

Ao administrar dexametasona em ratos por alguns dias, em doses crescentes que variavam entre 0.5 e 16mg/kg/dia e, em seguida, fazer um ferimento no dorso desses animais, alguns autores demonstraram que há uma diminuição significativa da capacidade de suportar tração no local da ferida em relação à resistência original da pele. Os resultados mostraram que esse efeito é devido a alterações na organização do colágeno, que é o que proporciona resistência à ferida. A exposição crônica a dexametasona causa baixa densidade do colágeno total em todos os tempos estudados, recuperando após o estabelecimento da cicatriz, apenas 80% da resistência original da pele (HAWS et al.,1994; TENIUS et al., 2007).

Assim, para contribuir com as informações que existem na literatura, decidiu-se desenvolver esse estudo, que buscou conhecer a ação da droga antiinflamatória, dexametasona, nos processos regenerativos da cauda dos peixes teleósteos, também rica em colágeno.

2 Objetivo

Neste trabalho o objetivo foi avaliar os efeitos da dexametasona sobre as nadadeiras caudais de *Cyprinus carpio* durante o processo de regeneração, por meio de análises histológicas e estatísticas, por comparação das medidas das áreas regeneradas das nadadeiras dos animais do grupo controle e tratado com dexametasona.

3 Material e Métodos

3.1 *Material*

Alevinos de carpa, *Cyprinus carpio*, provenientes de uma piscicultura localizada em Monte Mor/SP (Latitude: 22º 56' 48" S; Longitude: 47º 18' 57" O), cidade próxima à Campinas, foram mantidos em quarentena, no Laboratório de Bioensaios em Peixes do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP – UNICAMP, em tanques estoque com água declorada e limpa, à temperatura de 25°C e aeração constante, para garanti-los saudáveis (Fig. 5).

Os peixes foram alimentados diariamente com ração e os tanques eram limpos duas vezes por semana para a retirada de excrementos e restos de alimentos. Esta operação foi realizada por sifonamento e metade do volume da água, declorada e limpa, era reposta.

3.2 *Métodos*

3.2.1 *Montagem dos aquários*

Antes de iniciar o projeto de mestrado, foram desenvolvidos ensaios prévios para definir a concentração de dexametasona que deveria ser utilizada nos experimentos.

Para isso, foram montados dois aquários de vidro, contendo água declorada e limpa, mantidos à temperatura de 25°C e sob aeração constante.

No primeiro aquário foi dissolvida 25mg/L da dexametasona (Henrifarma, São Paulo, Brasil), e o segundo aquário foi mantido apenas com água e serviu como controle.

Após 24 horas, os peixes distribuídos nesses aquários foram anestesiados com benzocaína (1:10000) (SYNTH, Brasil) e tiveram suas nadadeiras caudais amputadas transversalmente (com uma navalha afiada) no sentido dorso-ventral, a 3 mm do pedúnculo muscular da cauda (de acordo com BECERRA et al., 1996). Os peixes foram colocados de volta nos respectivos aquários para que ocorresse a regeneração.

Diariamente, até o final do experimento, toda a água de cada aquário foi trocada por água limpa e, no aquário experimental, foi acrescentada a dexametasona.

A coleta das nadadeiras em regeneração foi feita oito dias após a amputação e as amostras foram fixadas em Bouin aquoso por seis horas e processadas para permitir estudos ao microscópio de luz.

Verificou-se a ação da droga no processo e para os experimentos desenvolvidos nessa pesquisa permitirem uma melhor avaliação da ação da dexametasona na regeneração, decidiu-se pela utilização da droga em dose de 20 mg/L.

Assim, foram montados dois aquários de vidro com água declorada e limpa, temperatura de 25°C e aeração constante. Sessenta peixes dos tanques estoque foram coletados ao acaso, pesados e medidos a olho nu sobre uma folha de papel milimetrado e apresentaram tamanhos médios de 6,4 cm e peso médio de 3,4 gramas. Depois, os peixes foram distribuídos nos dois aquários (30 peixes para o grupo controle e 30 peixes para o grupo tratado) (Fig. 6), de forma a manter a proporção de 1 grama de peixe para 1 litro de água de acordo com ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD, 1992).

No aquário denominado grupo tratado, a dexametasona (Henrifarma, São Paulo, Brasil) foi dissolvida na concentração de 20mg/L. A adição da dexametasona foi feita após uma semana, garantindo assim um período de adaptação aos peixes. O aquário do grupo controle foi mantido apenas com água.

Após 24 horas, os peixes foram anestesiados com benzocaína (1:10000) (SYNTH, Brasil) e, com o auxílio de papel milimetrado (Figs. 7 e 8), tiveram suas nadadeiras caudais amputadas transversalmente (com uma navalha afiada) no sentido dorso-ventral, a 3 mm do pedúnculo muscular da cauda (Figs. 9 e 10) (de acordo com BECERRA et al., 1996). Os animais voltaram para seus respectivos aquários para que a regeneração da nadadeira pudesse ocorrer.

Diariamente, até o final do experimento, toda a água de cada aquário foi trocada por água limpa e declorada e, no aquário experimental, foi acrescentada a dose de 20mg/L da dexametasona.

Nos intervalos de um, dois, quatro, seis, oito e 10 dias de regeneração após a amputação, os animais foram anestesiados novamente e tiveram a região regenerada de suas nadadeiras medidas a olho nu com o auxílio de um papel milimetrado. Em seguida, para os estudos histológicos, as nadadeiras foram excisadas e fixadas em Bouin aquoso por seis horas. Foram utilizados cinco espécimes para cada intervalo de tempo.

As amostras foram processadas, da maneira descrita abaixo, para permitir estudos ao microscópio de luz.

3.2.2 *Preparação das amostras para microscopia de luz*

Após a fixação em Bouin aquoso, as nadadeiras em regeneração excisadas, foram lavadas três vezes em álcool 50%, sendo 10 minutos em cada troca de álcool. Posteriormente, o material foi colocado em álcool 70% onde foram deixados por aproximadamente 24 horas.

As nadadeiras foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool (álcool 80, 95 e 100%) por 10 minutos em cada troca.

Em seguida, o material foi passado em álcool-xilol (1:1) e xilol puro por cinco minutos, e parafina líquida a 60ºC por 20 minutos para ser incluído em parafina à temperatura ambiente, em formas apropriadas, até a sua solidificação.

Foram feitos cortes histológicos de 5 μm que foram postos em lâminas de vidro e após 24h foram desparafinizados em xilol puro em dois banhos de 20 minutos e, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (álcool 100, 95, 80 e 70%) por 5 minutos em cada troca. Após esse procedimento os cortes foram lavados em água destilada e corados com hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e picrosirios-hematoxilina.

3.2.2.1 *Técnica de coloração pela hematoxilina e eosina (H.E.):*

Método mais utilizado em histologia para células em geral, em que os núcleos e também as substâncias basófilas do citoplasma coram-se de azul escuro a roxo pela hematoxilina, pois, por este ser um corante básico cora estruturas ácidas (por exemplo, ácidos nucléicos). Por sua vez, os tecidos musculares, colágeno, hemácias e outras estruturas acidófilas coram-se em vários tons de rosa a vermelho pela eosina. Sendo um corante ácido, a eosina vai evidenciar estruturas básicas (por exemplo, proteínas básicas presentes no citoplasma e na matriz extracelular) (BEHMER et al., 1976; JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Após hidratação do preparado histológico, realizou-se o protocolo abaixo:

Coloração com Hematoxilina de Erlich – 1 banho de 3 minutos;

Lavagem em água corrente – 5 vezes rapidamente e 1 banho de 5 minutos;

Lavagem com água destilada – uma vez rapidamente;

Coloração com Eosina Y alcoólica 0,5% – 1 banho de 5 minutos;

Lavagem com água destilada – 3 vezes rapidamente;

Desidratação e montagem.

3.2.2.2 *Técnica de coloração pelo tricrômico de Masson:*

Método que consiste em utilizar três corantes distintos, distinguindo melhor a organização tecidual, em relação ao H.E. Apresenta como resultado a tonalidade avermelhada, dada pela fucsina ácida, para citoplasma, fibras musculares, queratina, fibras intercelulares; a cor azul, dada pelo corante azul de anilina, para fibras colágenas, muco, cartilagem e osso; e a cor azul mais escura a roxo, dada pela hematoxilina, para núcleos (BEHMER et al., 1976).

Após hidratação do preparado histológico, realizou-se o protocolo abaixo:

Coloração com Hematoxilina de Erlich – 1 banho de 3 minutos;

Lavagem com água corrente – 5 vezes rapidamente e 1 banho de 5 minutos;

Lavagem com água destilada – uma vez rapidamente;

Coloração com Fucsina ácida – 1 banho de 2 minutos;

Lavagem com água destilada – 5 a 6 vezes rapidamente;

Coloração com Azul de anilina – 1 banho de 5 minutos;

Lavagem com água destilada – uma vez rapidamente;

Desidratação e montagem.

3.2.2.3 *Técnica de coloração pelo picrosirios-hematoxilina:*

Método utilizado para os tecidos em geral e para o tecido conjuntivo em particular. Segundo Junqueira & Junqueira (1983) é um dos tricrômicos descritos na literatura de maior eficiência e resultados mais nítidos. Ele cora a proteína colágeno presente nas fibras colágenas e reticulares, cartilagens e membranas basais em vermelho pelo sirius red. Cora os núcleos em azul escuro ou roxo pela hematoxilina, e as células epiteliais e musculares em róseo, pelo ácido pícrico (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA 1983).

Após hidratação do preparado histológico, realizou-se o protocolo abaixo:

Coloração em Sirius red – 1 banho de 40 minutos;

Lavagem com água destilada – 5 a 6 vezes rapidamente;

Colração com Hematoxilina de Erlich – 1 banho de 2 minutos;

Lavagem com água corrente – 3 vezes rapidamente e 1 banho de 5 minutos

Lavagem com água destilada – uma vez rapidamente;

Desidratação e montagem.

3.3 *Análise Estatística*

Vinte e cinco cortes histológicos de nadadeiras de cinco peixes em cada intervalo de regeneração, selecionados ao acaso, foram fotografados em fotomicroscópio convencional conjugado com software de análise de imagem Image Pro-Plus (versão 4.1.12; Media Cybernetics, E.U.A.). As imagens das áreas das nadadeiras em regeneração foram medidas com uma lente objetiva com aumento de 2x e analisadas morfometricamente.

Os resultados foram comparados estatisticamente por meio das medidas das áreas de cada intervalo de tempo, usando-se análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas foram feitas usando-se o programa estatístico INSTAT v 2.01 (GraphPad, San Diego, CA. USA).

Legenda das figuras

Figura 5. Tanques plásticos estoque para quarentena e manutenção dos peixes.

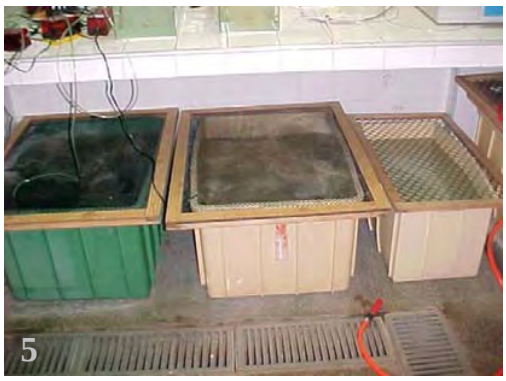
Figura 6. Aquários experimentais, com aeração constante e temperatura controlada, contendo os peixes *Cyprinus carpio* do grupo controle e tratado com dexametasona na dose de 20mg/L.

Figura 7. Verificação com auxílio de papel milimetrado, do comprimento total do peixe e medindo os três milímetros após o pedúnculo caudal para a secção da nadadeira.

Figura 8. Peixe de aproximadamente 7,5 cm de comprimento, antes da amputação da nadadeira caudal.

Figura 9. Corte da nadadeira caudal de um representante de *Cyprinus carpio* no sentido dorso-ventral, a 3 mm do pedúnculo muscular da cauda.

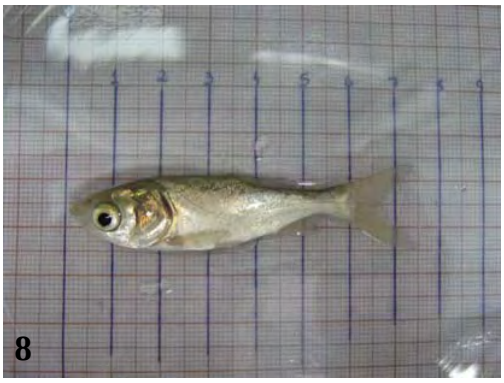
Figura 10. Peixe anestesiado, após a amputação transversal da nadadeira caudal.



5

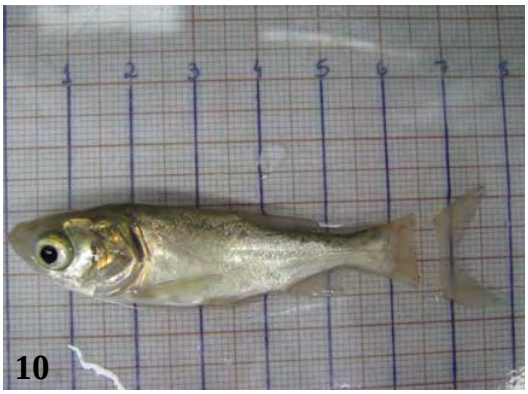
6

7



8

9



10

4 Resultados

As carpas (*C. carpio*) mantidas em quarentena nos tanques estoque apresentaram-se saudáveis, não tendo sido verificado nenhum comportamento que comprometesse os experimentos.

Os resultados do ensaio prévio (experimento piloto) mostraram que no grupo controle a regeneração aconteceu de acordo com a literatura e as lepidotriquias se desenvolveram normalmente (Figs. 11 e 12). Enquanto as figuras 13 e 14 mostram os resultados utilizando dose de 25mg/L de dexametasona, houve a ação da droga no processo. Com oito dias de regeneração verificou-se no grupo tratado que o epitélio e o tecido conjuntivo haviam crescido na direção próximo-distal e as células da camada basal do epitélio apresentavam-se altas (cilíndricas). No entanto, as células do blastema não se dispuseram uma ao lado da outra, formando uma fileira única de células, para iniciar a síntese da matriz lepidotriquial, de tal forma que ocorreu a completa inibição da regeneração das lepidotriquias.

A partir desses resultados, foi montado então o experimento definitivo.

As nadadeiras caudais foram cortadas e os peixes recolocados nos aquários. Notou-se que a perda de sangue foi mínima após a amputação e, como os peixes estavam bem, a lesão começou a ser reparada logo em seguida. Foi observado que logo os peixes recuperaram seu comportamento natatório, mostrando comportamento normal nos dois grupos de tratamento.

Nessa fase, os peixes foram constantemente e atentamente observados e nenhum comportamento irregular foi verificado. Essas observações são importantes, pois, fatores negativos como má qualidade da água, contaminação microbiológica e outros, podem perturbar o comportamento dos animais. A não ingestão do alimento e mudanças no comportamento natatório são exemplos de aspectos importantes para dar continuidade ou não ao experimento.

No primeiro e segundo dias após a amputação a regeneração não foi mensurável a olho nu. As medidas das nadadeiras regeneradas foram feitas a partir do 4º dia de regeneração sobre uma folha de papel milimetrado (Fig. 15). Utilizando-se cinco peixes para cada intervalo de tratamento, os peixes foram anestesiados e as regiões regeneradas das nadadeiras coletadas (Fig. 16). As medidas mostraram que houve diferenças de tamanho entre o grupo controle e o grupo tratado (Fig. 17). A medida da nadadeira de

um peixe do grupo controle com seis dias apresentou aproximadamente 2 mm de região regenerada (Fig. 17 (A)), enquanto a medida da nadadeira de um peixe do grupo tratado, apresentou aproximadamente 1 mm de região regenerada (Fig. 17 (D)). A medida aproximada de região regenerada da nadadeira de um peixe do grupo controle com oito dias foi 4 mm (Fig. 17 (B)), enquanto a do grupo tratado, foi 2 mm (Fig. 17 (E)). E 10 dias depois da amputação um peixe do grupo controle apresentou 5 mm de região regenerada da nadadeira (Fig. 17 (C)), enquanto um peixe do grupo tratado, apresentou a medida de 2 mm de região regenerada (Fig. 17 (F)). As médias obtidas são mostradas na Tabela 1 e na Figura 18.

Com as análises dos cortes histológicos do experimento no primeiro e segundo dia após a amputação observou-se que a lesão foi completamente coberta pelas células epidérmicas laterais das nadadeiras que não sofreram nenhum dano e desde as primeiras horas após a lesão migraram para a região amputada e cobriram a ferida em todas as nadadeiras, formando a capa epidermal apical tanto nos peixes do grupo controle como nos do grupo tratado, demonstrando assim que não houve diferenças entre os grupos (Figs. 19 e 20).

No 4º dia de regeneração, logo abaixo da epiderme das nadadeiras, houve a formação de uma massa de células conjuntivas com coloração mais escura, o blastema (Figs. 21 e 22). A partir desse dia as diferenças entre os grupos controle e tratado começaram a aparecer e notou-se que o blastema não se desenvolveu da mesma forma nos dois grupos; no grupo controle o blastema apresentou-se mais desenvolvido (Fig. 21) do que o do grupo tratado (Fig. 22).

Com seis dias de regeneração, as nadadeiras caudais dos peixes do grupo controle apresentaram regeneração normal, ou seja, o epitélio e o tecido conjuntivo haviam crescido na direção próximo-distal, as células da camada basal do epitélio apresentavam-se altas (cilíndricas), as células do blastema se dispuseram formando uma fileira única de células uma ao lado da outra (células estas chamadas agora de escleroblastos) e iniciaram a síntese da matriz lepidotriquial, na região voltada para a membrana basal do epitélio (Fig. 23).

Na Figura 24 observa-se com mais detalhes a camada basal do epitélio e o blastema, e na Figura 25, os escleroblastos enfileirados de ambos os lados do hemissegmento lepidotriquial em regeneração. Percebe-se que a síntese da matriz

também ocorre na outra face da lepidotriquia, proporcionando, já no sexto dia de regeneração, um crescimento na largura do raio.

Na Figura 26 pode-se observar, com seis dias de regeneração, como em um peixe do grupo controle a área regenerada da nadadeira caudal apresenta um longo trecho de tecido epitelial e conjuntivo regenerado. No entanto, as nadadeiras do grupo tratado também apresentaram as células da camada basal do epitélio cilíndricas, envolvidas na síntese da membrana basal, mas, diferentemente do controle, a matriz lepidotriquial ainda não começou a ser sintetizada e o desenvolvimento do tecido conjuntivo foi afetado, mostrando uma inibição no processo (Fig. 27).

Aos oito e 10 dias de regeneração já não há mais muitas diferenças histológicas entre os grupos controle e tratado (Figs. 28, 29, 30 e 31). Oito dias após a amputação da nadadeira nota-se no grupo controle que as lepidotriquias cresceram em comprimento e largura praticamente todo o seu tamanho e o grupo tratado, apesar de ainda não ter desenvolvido o mesmo que o grupo controle, está a caminho, pois, aos 10 dias no processo regenerativo já aparecem as pequenas espículas chamadas actinotriquias, que sustentam a borda da membrana da nadadeira, e, como aparecem nos dois grupos (Figs. 32 e 33) constata-se que a regeneração não foi cessada nos peixes do grupo tratado com dexametasona, foi mais lenta.

A partir dos quatro dias após a lesão, foram realizadas as análises morfométricas das áreas regeneradas. Foram fotografadas e medidas as regenerações de 25 cortes histológicos de cinco peixes de cada intervalo.

As análises das medidas das áreas regeneradas confirmam os dados obtidos macroscopicamente e observados ao microscópio. Houve diferença na regeneração do grupo tratado quando comparado ao grupo controle nos intervalos de quatro, seis, oito e 10 dias de regeneração.

Verificou-se que, em cada intervalo analisado, a medida da área regenerada das nadadeiras dos peixes expostos à droga (grupo tratado) eram menores que a medida da área regenerada das nadadeiras dos peixes do grupo controle (Figura 34).

Embora a média das medidas entre o grupo controle e o tratado com quatro dias de regeneração não tenha apresentado diferença estatística significativa, pois o valor de P é 0,6605, foi constatado que houve diferença significativa quando os dois grupos foram comparados nos intervalos de seis, oito e 10 dias de regeneração, nos quais o valor de P foi <0,0001 o que é considerado extremamente significativo.

Dessa maneira, os dados morfométricos e histológicos mostraram que a regeneração das nadadeiras caudais ocorreu normalmente nos peixes do grupo controle, mas, o processo não se desenvolveu adequadamente nos peixes do grupo tratado.

Legenda das figuras

Figuras 11 e 12. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* do grupo controle do projeto piloto com oito dias de regeneração.

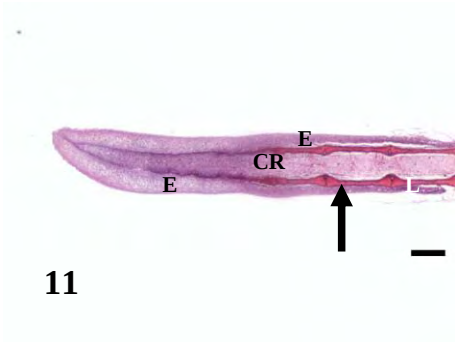
Figura 11. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 200 µm.

Figura 12. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 50 µm

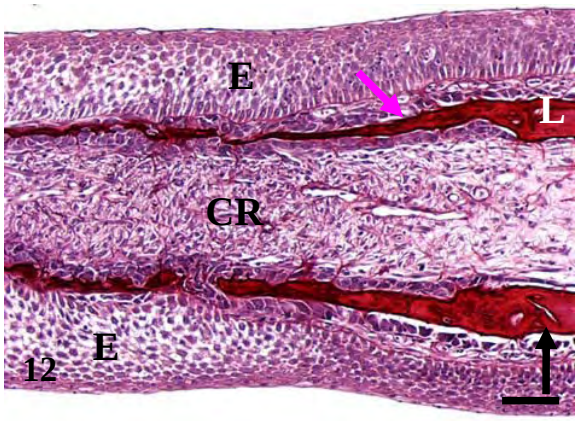
Figuras 13 e 14. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* do grupo tratado do projeto piloto com 25mg/L de dexametasona, com oito dias de regeneração.

Figura 13. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Seta verde: células cilíndricas da camada basal do epitélio, envolvidas na síntese da membrana basal do epitélio. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 50 µm

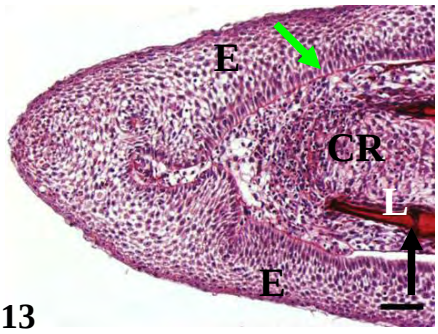
Figura 14. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Seta verde: células cilíndricas da camada basal do epitélio, envolvidas na síntese da membrana basal do epitélio. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 30 µm



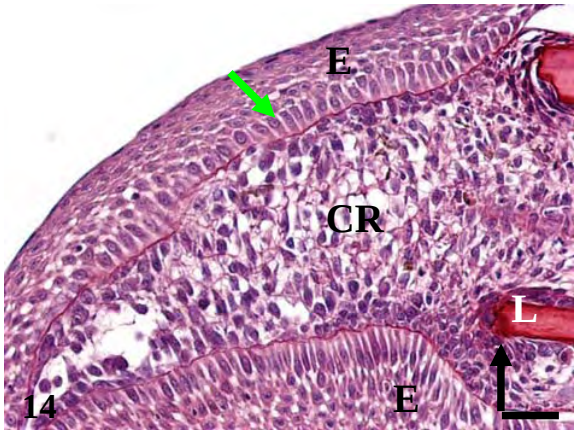
11



12



13



14

Legenda das figuras

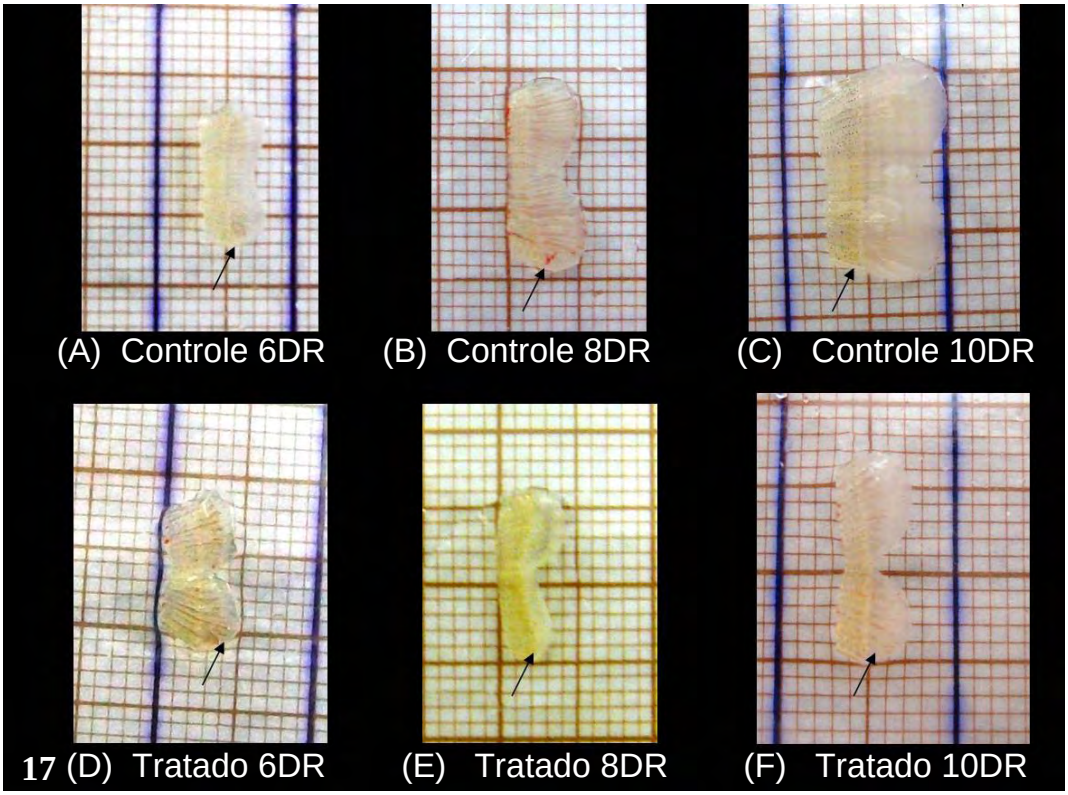
Figura 15. Peixe *Cyprinus carpio* do grupo controle, com oito dias de regeneração, mostrando a nadadeira caudal com 3 mm de regeneração. A seta mostra o local da amputação. A região regenerada encontra-se à direita da seta.

Figura 16. O mesmo peixe da figura anterior, com a nadadeira caudal excisada, no momento da coleta, para processamento para análise histológica.

Figura 17. Nadadeiras coletadas de peixes *Cyprinus carpio* do grupo controle e tratado com seis, oito e 10 dias de regeneração, com auxilio ao fundo de papel milimetrado para medir aproximadamente as diferenças no desenvolvimento do processo de regeneração. As setas mostram as regiões onde as nadadeiras foram amputadas. As regiões regeneradas se encontram à direita da seta.

15

16


(A) Controle 6DR
(B) Controle 8DR
(C) Controle 10DR
(D) Tratado 6DR
(E) Tratado 8DR
(F) Tratado 10DR

17

Tabela 1. Média e desvio padrão do comprimento a olho nu da região regenerada, das nadadeiras caudais de cinco peixes *Cyprinus carpio* do grupo controle e cinco do grupo tratado com dexametasona 20 mg/L, em cada intervalo de tempo.

Dias após a amputação	Tratamentos	
	Região regenerada (cm)	
	Controle	Tratado
4	0,10 ± 0	0,05 ± 0,04
6	0,17 ± 0,06	0,06 ± 0,02
8	0,30 ± 0	0,19 ± 0,06
10	0,41 ± 0,09	0,23 ± 0,05

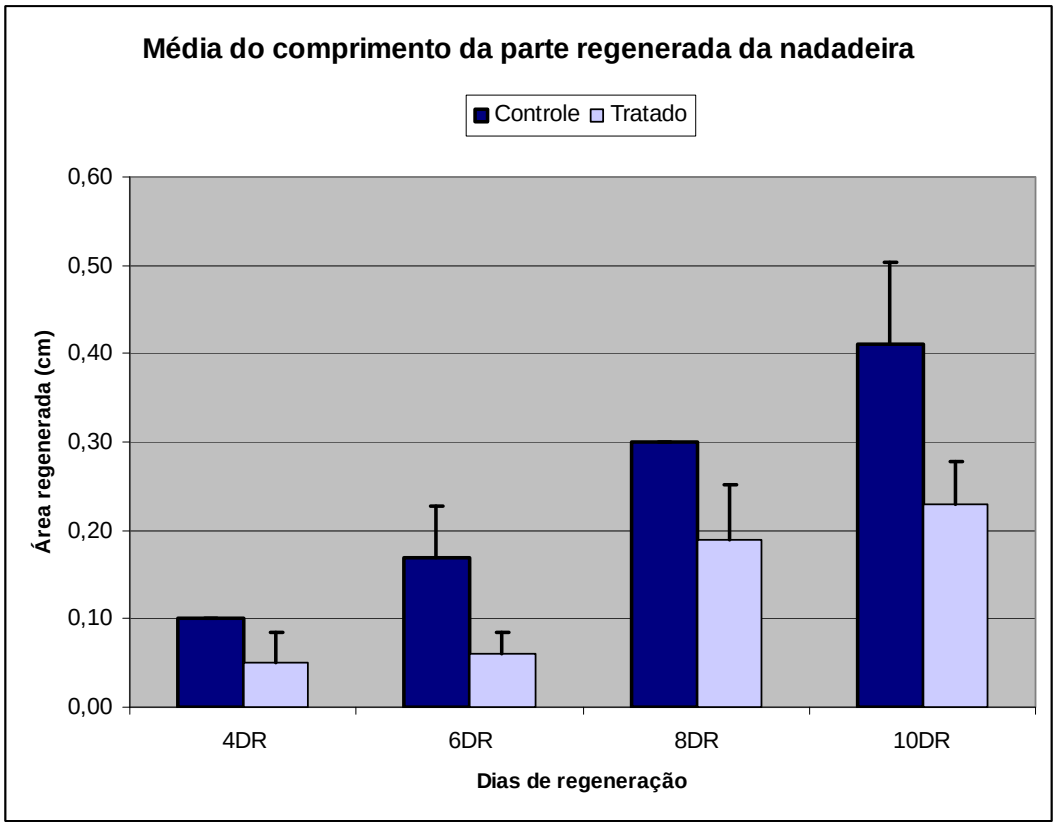


Figura 18. Gráfico mostrando o desenvolvimento do 4º ao 10º após a amputação da região regenerada das nadadeiras caudais de *Cyprinus carpio*, observado a olho nu nos peixes do grupo controle e no grupo tratado com 20mg/L de dexametasona.

Legenda das figuras

Figuras 19 e 20. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* com um dia de regeneração.

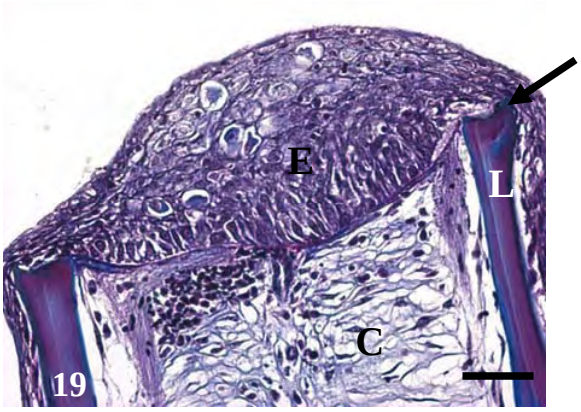
Figura 19. Grupo controle. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; observar a capa epidermal apical; C: tecido conjuntivo não regenerado. Tricrômico de Masson. Barra: 30 µm.

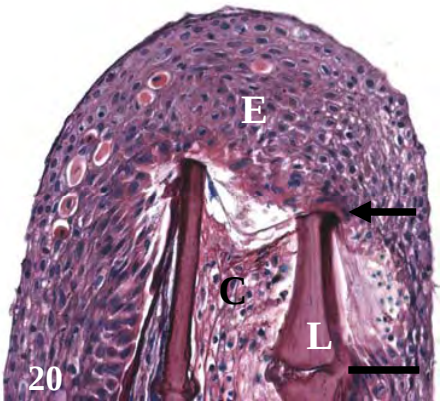
Figura 20. Grupo tratado com 20mg/L de dexametasona. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; observar a capa epidermal apical; C: tecido conjuntivo não regenerado. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 30 µm.

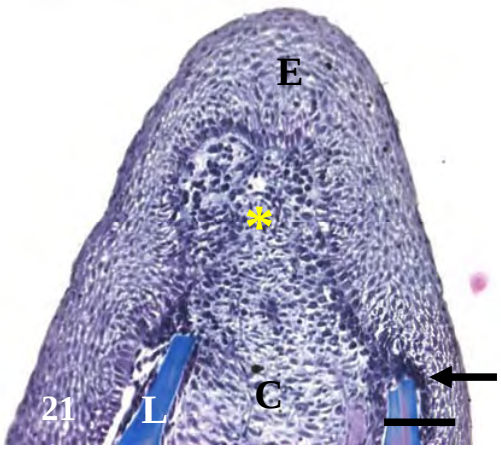
Figuras 21 e 22. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* com quatro dias de regeneração.

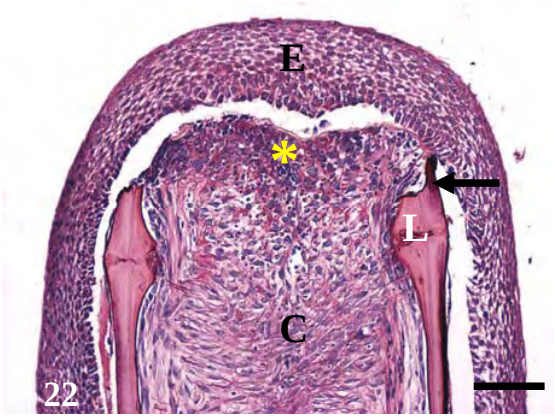
Figura 21. Grupo controle. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; Asterisco: local onde se localiza o blastema. Tricrômico de Masson. Barra: 50 µm.

Figura 22. Grupo tratado com 20mg/L de dexametasona. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; Asterisco: local onde se localiza o blastema. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 50 µm.


E
L
C
19


E
C
L
20


E
*
21
L
C


E
*
L
C
22

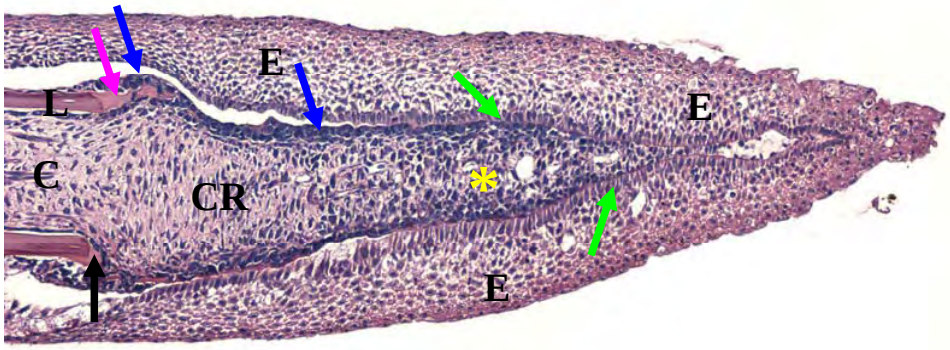
Legenda das figuras

Figuras 23, 24 e 25. Cortes longitudinais de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* do grupo controle com seis dias de regeneração.

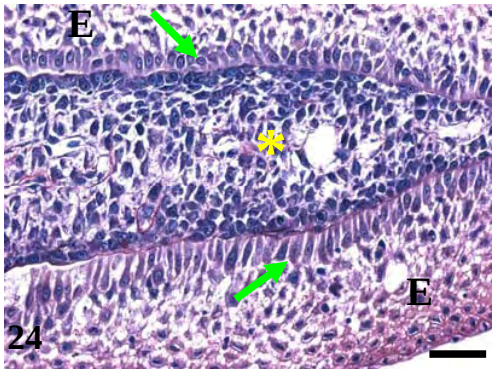
Figura 23. União de três fotomicrografias em aumento 10x, onde se observa todas as características. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; Seta azul: escleroblastos; E: epiderme em regeneração; C: o tecido conjuntivo não regenerado; CR: tecido conjuntivo em regeneração; Asterisco: local onde se localiza o blastema; Setas verdes: células cilíndricas da camada basal do epitélio, envolvidas na síntese da membrana basal do epitélio. Picrosirios-hematoxilina.

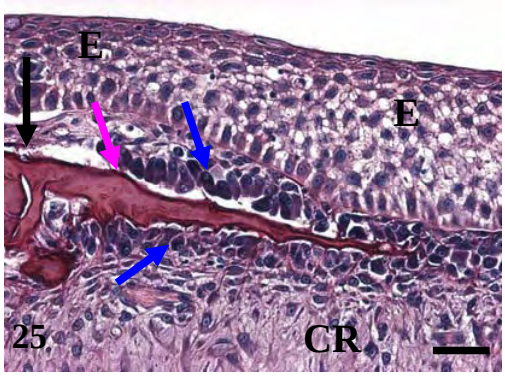
Figura 24. Maior aumento mostrando em detalhe as células cilíndricas da camada basal do epitélio (setas verdes), envolvidas na síntese da membrana basal com seis dias de regeneração. E: epiderme em regeneração; Asterisco: local onde se localiza o blastema. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 50 µm.

Figura 25. Maior aumento mostrando em detalhe os escleroblastos que aparecem do outro lado do hemissegmento da lepidotriquia com seis dias de regeneração. Seta preta: local de amputação; Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração; Setas azuis: escleroblastos. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 50 µm.



23





Legenda das figuras

Figuras 26 e 27. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* com seis dias de regeneração.

Figura 26. Grupo controle. Seta preta: local de amputação; Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 200 µm.

Figura 27. Grupo tratado com 20mg/L de dexametasona. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 50 µm.

Figuras 28 e 29. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* com oito dias de regeneração.

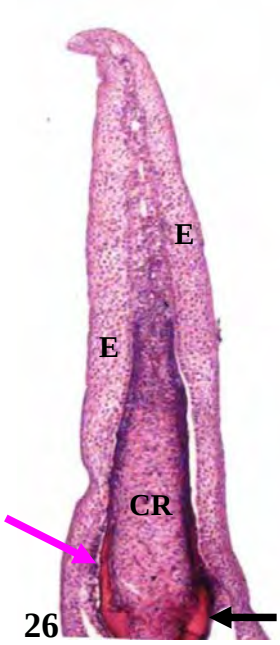
Figura 28. Grupo controle. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 200 µm.

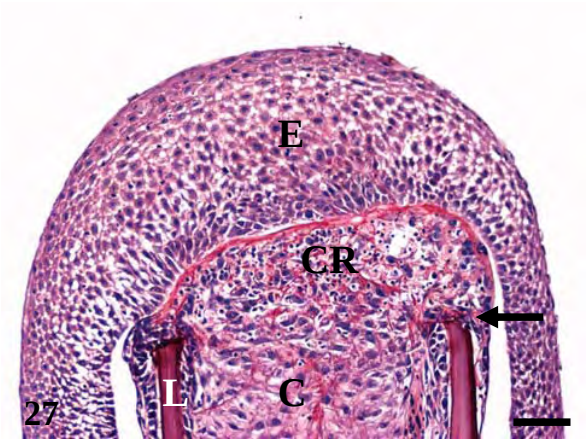
Figura 29. Grupo tratado com 20mg/L de dexametasona. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 200 µm.

Figuras 30 e 31. Cortes longitudinais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* com 10 dias de regeneração.

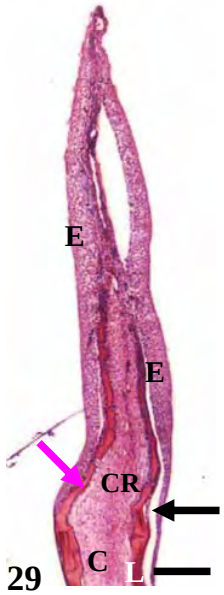
Figura 30. Grupo controle. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 200 µm.

Figura 31. Grupo tratado com 20mg/L de dexametasona. Seta preta: local de amputação; L: lepidotriquia velha (não regenerada); Seta rosa: lepidotriquia em regeneração; E: epiderme em regeneração; C: tecido conjuntivo não regenerado; CR: tecido conjuntivo em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 200 µm.


E
E
CR
26


E
CR
L
C
27

E
E
CR
C L
28


E
E
CR
C L
29

E
E
CR
L C
30

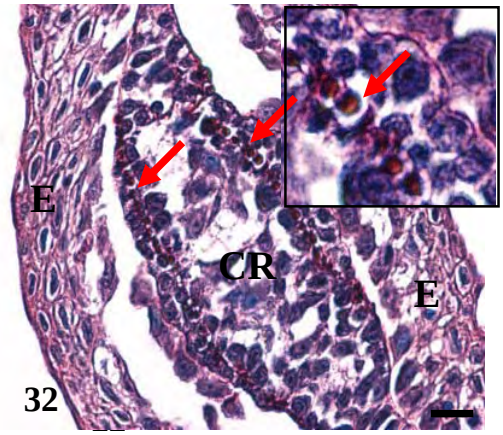
E
E
CR
C L
31

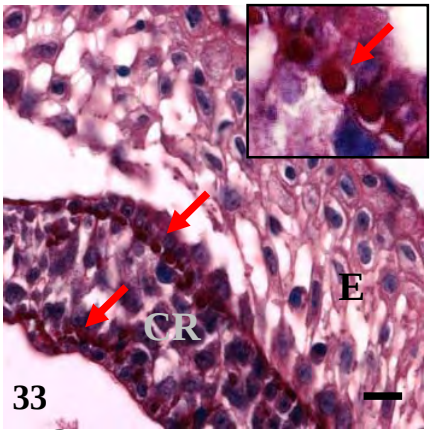
Legenda das figuras

Figuras 32 e 33. Cortes transversais da região distal de nadadeiras caudais de peixe *Cyprinus carpio* com 10 dias de regeneração.

Figura 32. Grupo controle. E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração; Setas vermelhas: actiniotriquias em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 10 µm.

Figura 33. Grupo tratado com 20mg/L de dexametasona. E: epiderme em regeneração; CR: tecido conjuntivo em regeneração; Setas vermelhas: actiniotriquias em regeneração. Picrosirios-hematoxilina. Barra: 10 µm.


E
CR
E
32


E
CR
33

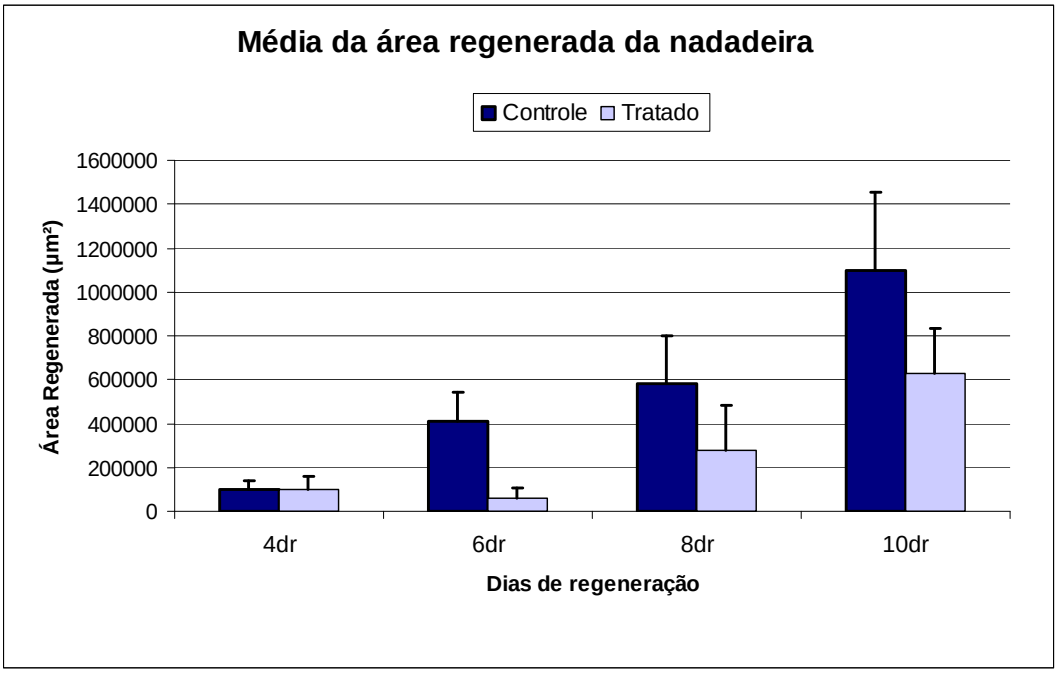


Figura 34. Gráfico mostrando a média das áreas da região regenerada das nadadeiras caudais de *Cyprinus carpio* do 4º ao 10º dia após a amputação obtida nos peixes do grupo controle e do grupo tratado com 20mg/L de dexametasona.

5 Discussão

O ser humano encontra-se permanentemente sujeito a lesões que podem levar à morte celular e destruição dos tecidos. A cicatrização, uma resposta a esta lesão, representa uma tentativa de se manter a estrutura e a função normais. Mas, alguns organismos mais basais como, por exemplo, os peixes, possuem a capacidade de regeneração. A regeneração é a reposição perfeita de uma célula ou tecido lesionado (ABELOOS, 1932; GOSS; STAGG, 1957; KIORTSIS; TRAMPUSCH, 1965; HAY, 1966; MATTSON, 1976; ORD; STOCKEN, 1984; MUNEOKA; BRYANT, 1984; MUNEOKA et al., 1986).

Diferentemente da formação de um blastema com células indiferenciadas, que ocorre em alguns animais, se lesionados, os mamíferos têm uma deficiência em células para regenerar. Algumas células ou tecidos são comuns entre os vertebrados em geral, e essa característica, junto com a anatomia relativamente simples da nadadeira caudal do teleósteo, faz desse órgão um vantajoso modelo para pesquisas e estudos da capacidade de regeneração de tecidos e órgãos (MASAKI; IDE, 2007; YIN; POSS, 2008).

Embora as nadadeiras de peixes teleósteos regenerem com facilidade em condições normais, elas são extremamente sensíveis a fatores como variações na temperatura, intensidade da luz e ação de alguns contaminantes (JOHNSON; WESTON, 1995; NECHIPORUK; KEATING, 2002).

Em estudos realizados no laboratório de Bioensaios em peixes do Departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP, se observou que as drogas antiinflamatórias podem ou não interferir na síntese do colágeno lepidotriquial. Dentre as drogas já estudadas pelo grupo, verificou-se, por exemplo, que a aspirina interfere na regeneração das lepidotriquias, as quais não se regeneram completamente, e as actiniotriquias das nadadeiras regeneradas dos peixes tratados não se formam (BECHARA et al., 2003), enquanto que o estudo feito com o naproxeno mostrou que a análise morfométrica da área regenerada não apresentou nenhuma diferença significativa (BÖCKELMANN; BECHARA, 2004, 2007).

Muitos estudos têm mostrado que o antiinflamatório dexametasona têm efeitos inibitórios no metabolismo de tecidos conjuntivos em mamíferos (BEER et al., 2000; OISHI et al., 2002). Ele pode acelerar a degradação da cartilagem, por inibir a proliferação de condrócitos e a formação de matriz extracelular (SU et al., 1996; MIYAZAKI et al., 2000).

Além do tecido conjuntivo, sabe-se que esta substância afeta também tecidos epiteliais. Por este motivo os efeitos do uso crônico da dexametasona na regeneração dos tecidos epitelial e conjuntivos têm gerado interesse significativo, principalmente na área médica, uma vez que se trata de uma droga glicocorticóide esteróide bastante utilizada em inúmeros tratamentos.

Sabe-se, por exemplo, que devido à capacidade de inibir a produção de colágeno, o uso continuado de corticóides pode elevar o número de complicações pós-operatórias podendo ocorrer a diminuição da resistência da cicatriz a trações (TENIUS et al., 2007).

Bechara et al. (2000) mostraram que, para alguns peixes, a regeneração das lepidotriquias foi deficiente após administração de dexametasona (na dose de 0,25 mg/L), indicando uma ação dessa droga na síntese do colágeno lepidotriquial. Ao microscópio eletrônico, esses autores mostraram a ocorrência de um fenômeno descrito como laminação ou splitting da lâmina basal do epitélio (GHADIALLY, 1997), sugerindo, também, um defeito no colágeno.

A fim de se analisar o efeito de uma maior concentração da dexametasona, foram realizados ensaios prévios com aquários controle e tratado com a dose de 25 mg/L. Ocorreu a completa inibição da regeneração das lepidotriquias e confirmou-se a ação da droga no processo. Mas, para os experimentos científicos desenvolvidos nessa pesquisa permitirem uma melhor avaliação da ação da dexametasona na regeneração, decidiu-se pela utilização da droga em dose de 20 mg/L.

No presente estudo, as médias das medidas das regiões regeneradas das nadadeiras caudais, geraram resultados nos quais se podem constatar o tamanho da regeneração a partir do quarto dia até a última observação aos 10 dias. A parte regenerada foi medida só a partir do quarto dia, pois foi quando se apresentou mensurável a olho nu. A média foi de 1 mm para o grupo controle e cerca de metade (0,5mm) para o grupo tratado. Sabe-se que, no primeiro e segundo dias de regeneração ocorrem os primeiros processos regenerativos, como a cicatrização, o crescimento do epitélio e a formação do blastema, mas, no entanto, não é possível a realização da medida macroscópica da região em regeneração.

A concentração utilizada de 20mg/L de dexametasona alterou o tempo conhecido que as nadadeiras dos teleósteos levam para se reconstituir, produzindo diferença nítida no crescimento das nadadeiras caudais dos animais do grupo tratado

quando comparado ao grupo controle. As observações mostram que a dexametasona afetou a regeneração das nadadeiras, atrasando o processo, mas não causando a completa inibição da regeneração.

Nos dois primeiros dias após a amputação, se observou que não houve muitas diferenças entre os grupos controle e tratado.

Mas quatro dias após lesionadas, as nadadeiras dos peixes do grupo tratado não apresentaram regeneração como às dos peixes do grupo controle. Observou-se que as células da camada basal do epitélio ainda não se apresentavam altas, essencial para a síntese da membrana basal, e, comparando ao controle, o blastema se desenvolveu menos. A partir desse ponto, conseqüentemente, a regeneração no grupo tratado mostrou um atraso significativo.

A formação do blastema é fundamental para a regeneração das nadadeiras como um todo e para a regeneração dos elementos esqueléticos (lepidotriquias e actinotriquias). Fatores moleculares como o *Fgf (Fator de crescimento dos fibroblastos)* e de receptores para esses fatores (tais como o *Fgfr1*) são exemplos de genes que atuam na formação do blastema, e o bloqueio da sua expressão pode inibir a formação do mesmo. (POSS et al., 2000). Esses autores usaram uma concentração de 0,5 mg/L de uma droga lipolítica inibidora de fibroblastos (*Fgfr1*), a SU5402, que chamaram de *Ri*, e observaram a inibição da proliferação de células do blastema, com conseqüente inibição do processo de regeneração.

Outra substância estudada que afeta o desenvolvimento do blastema e a regeneração da nadadeira caudal, é a 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Zodrow; Tanguay (2003) injetaram doses de dois, oito, 14, 70 mg/g de peso corporal em *zebrafish* adultos e, houve a inibição da regeneração da nadadeira caudal em todos os intervalos analisados. As taxas de proliferação celular foram significativamente menores nos peixes expostos a droga.

Tem sido amplamente estudada a participação de genes como: *Msx* (genes da família homeobox presentes em vertebrados relacionados com seqüências de "*Drosophila* muscle segment homeobox" - *msh*); o *lef 1*; o *wnt 3*; o *wnt 5*; o *Shh* - *Sonic Hedgehog* (*Hedgehog* inicialmente identificado em *Drosophila*, requerido para o padrão de segmentação), entre outros, no processo de regeneração das nadadeiras dos teleósteos, principalmente em *zebrafish* (MURCIANO et al., 2002; NECHIPORUK; KEATING, 2002; POSS et al., 2003).

Akimenko et al. (1995) estudaram a expressão de quatro genes homeobox da família *Msx (MsxA, MsxB, MsxC e MsxD)* durante a regeneração da nadadeira observaram que a expressão desses genes é fortemente reinduzida durante o processo regenerativo. A expressão do gene *Msx* ocorre logo após 30h da lesão e atinge nível máximo entre o terceiro e quinto dias de regeneração, ou seja, aumenta muito durante a formação do blastema. À medida que a nadadeira volta ao tamanho normal a expressão do *Msx* diminui progressivamente e desaparece por volta do 12º dia de regeneração.

Outro estudo mostrou que alterações nos genes *Sdf1* (stromal-cell-derived factor-1) podem interromper a proliferação em áreas ao redor da epiderme e impedir a regeneração da nadadeira, uma vez que estes genes são importantes para a formação do blastema (DUFOURCQ; VRIZ, 2006).

Os dados desses trabalhos sugerem que um desenvolvimento deficiente, ou até mesmo uma inibição no processo de regeneração da nadadeira, está intimamente ligado a uma alteração na expressão desses genes.

De acordo com os resultados do presente estudo, a dexametasona na dose utilizada, afetou a formação do blastema e, portanto, a regeneração da nadadeira como um todo. A dexametasona pode ter influenciado na expressão dos genes necessários para o processo de regeneração, tal como o gene *Fgf* ou o gene *Msx* ou outros que estão envolvidos na formação do blastema. A dexametasona pode ter, ainda, inibido as células responsáveis pela síntese do colágeno, como aconteceu quando se usou a droga lipolítica SU5402 ou a substância 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin (ZODROW; TANGUAY, 2003). Ou, até mesmo, pode ter inibido as células produtoras de colágeno através da inibição da tradução do RNAm para o colágeno tipo II, assim como Kawashima *et al.* (2003) observaram em estudos com cultura de células.

Houve um atraso na regeneração das nadadeiras dos peixes do grupo tratado em todos os intervalos, mas isso foi maior no início do processo de regeneração, no 4º e 6º dias após a amputação. Nota-se que não houve muito avanço na regeneração de seis dias após a lesão quando se compara com a observada aos quatro dias nos peixes do mesmo grupo tratado.

Os resultados obtidos nesse período da pesquisa mostram que a dexametasona possivelmente interferiu, talvez por um fator químico, na expressão desses genes essenciais para a proliferação das células do blastema, prejudicando, assim, a completa regeneração dessas nadadeiras. O processo de regeneração ocorreu lentamente, mas não houve total inibição do processo. Os danos podem ter sido reparados durante o

desenvolvimento e proliferação das células do blastema, culminando com a regeneração propriamente dita. A utilização deste modelo de estudo histológico frente à utilização de drogas contribui para identificar como se dá a influência no processo regenerativo e na síntese do colágeno por excesso de corticóides.

Apesar de a partir do 8º dia a média das áreas regeneradas ser maior, mostrando um ganho de crescimento em comprimento e uma retomada na regeneração das nadadeiras dos peixes do grupo tratado, a principal diferença notada é na velocidade da regeneração, pois, aos oito e 10 dias após o início do processo regenerativo, quase não se percebe o ponto lesionado.

O presente estudo sugere que a dexametasona na dose utilizada nas condições experimentais, afetou os tecidos conjuntivos das nadadeiras, mas, provavelmente, a ação da droga não é irreversível.

Comparando o grupo tratado com o grupo controle verificou-se que nessa dose, de 20mg/L, a regeneração das nadadeiras apresentou um lento processo regenerativo e também, como nos ensaios, a dexametasona interferiu na regeneração das nadadeiras. Mas, talvez, cessando a aplicação da droga, pode-se voltar a ter a expressão da proteína em falta ou bloqueada, e, assim, retomar o processo.

Assim, os resultados comprovam que a nadadeira caudal é um bom modelo para estudos histológicos sobre a regeneração e a ação da toxicidade de drogas nesse processo, mas, com os estudos relatados acima, se percebe, também, que há muito sendo estudado no processo regenerativo molecular e, para se conhecer e compreender melhor todas as alterações em todas as fases é de grande importância a interação dessas formas de estudo.

6 Conclusões

– Através de estudos comparativos, foi possível demonstrar que a dexametasona, na concentração de 20mg/L, interfere na regeneração das nadadeiras caudais de peixes teleósteos *Cyprinus carpio* (carpas). Os dados comparativos, morfométricos e histológicos, mostraram que a dexametasona altera o processo regenerativo e as diferenças entre o grupo controle e o tratado aparece a partir do quarto dia do processo de regeneração.

– Os dados do presente estudo comprovam as poucas informações que existem na literatura de que a dexametasona é uma droga que inibe a produção de colágeno e assim interfere nos processos de regeneração. Os constituintes das nadadeiras dos peixes teleósteos contêm grande quantidade de colágeno e a regeneração foi afetada com a exposição ao medicamento.

– Porém, para uma melhor compreensão das alterações que acontecem em todas as fases da regeneração, a interação dos estudos histológicos com os estudos moleculares do processo é de fundamental importância.

7 Referências

ABELOOS, M. La Régénération et les Problèmes de la Morphogenèse. 6. ed. **Gauthier-villars & Cie**, Paris, p. 253, 1932.

ADVANI, S.; LAFRANCIS, D.; BOGDANOVIC, E.; TAXEL, P.; RAISZ, L. G.; KREAM, B. E. Dexamethasone suppresses *in vivo* levels of bone collagen synthesis in neonatal mice. **Bone**, Farmington, v. 20, p. 41-6, 1997.

AKIMENKO, M.; JOHNSON, S. L.; WESTERFIELD, M.; EKKER, M. Differencial induction of four msx homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. **Development**, Ontário, v. 121, p. 347-357, 1995.

AKIMENKO, M.; MARÍ-BEFFA, M.; BECERRA, J.; GÉRAUDIE, J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. **Dev. Dyn.**, Ontário, v. 226, p. 190-201, 2003.

ARITA, G. S. A re-examination of the functional morphology of the soft-rays in teleosts. **Copeia**, v. 4, p. 691-7, 1971. [S.l.]

AZEVEDO, P.; FROTA-PESSOA, O. Peixe. **Enciclopédia Mirador Internacional**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 8590, 1981.

BAULIEU, E. E. Some aspects of the mechanism of action of steroid hosmones. **Mol. Cell Biochem**., v. 7, p. 157-74, 1975. [S.l.]

BAXTER, J. D. Glucocorticoid hormone action. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 2, p. 605-59, 1976.

BECERRA, J.; MONTES, G. S.; BEXIGA, S. R. R.; JUNQUEIRA, L. C. U. Structure of the tail fin in teleosts. **Cell Tissue Res**., Málaga, v. 230, p. 127-37, 1983.

BECERRA, J.; JUNQUEIRA, L. C. U.; BECHARA, I. J.; MONTES, G. S. Regeneration of fin rays in teleosts: A histochemical, radioautographic, and ultrastructural study. **Arch. Histol. Cytol.**, Málaga, v. 59, n.1, p. 15-35, 1996.

BECHARA, I. J.; JOAZEIRO, P. P.; MARÍ-BEFFA, M.; BECERRA, J.; MONTES, G. S. Collagen-affecting drugs impair regeneration of teleost tail fins. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 273-80, 2000.

BECHARA, I. J.; BÖCKELMANN, P. K.; MONTES, G. S.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Inhibition of caudal fin actinotrichia regeneration by acetylsalicylic acid (aspirin) in teleosts. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Campinas, v. 20, p. 67-74, 2003.

BEER, H. D.; FASSLER, R.; WERNER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitam. Horm.**, Zurich, v.59, p. 217-39, 2000.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. de; NETO, A. G. de F. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. EDART – São Paulo Livraria Editora Ltda., Editora da Universidade de São Paulo, p. 48-49; 80; 116-117, 1976.

BLANC, M. Structure histologique des rayons de nageoires chez les poissons téléostéens. **Bull. Soc. Zool.**, France, v.72, p. 17-22, 1947.

BLANC, M. Stude histologique de la régénération des nageoires chez quelques poissons téléostéens. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, v.38, p. 52-64, 1949. [S.l.]

BÖCKELMANN, P. K. Estudo do efeito do naproxeno na regeneração da nadadeira caudal do peixe teleosteo Cyprinus carpio (carpa). **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. Campinas, SP. 2003. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000302166>. Acesso em: 20 maio 2008.

BÖCKELMANN, P. K.; BECHARA, I. J. Effect of naproxen on tail fin regeneration in teleost. **J. of Submicro. Cytology and Pathology**, Campinas, v. 36, n.1, p. 1-10, 2004.

BÖCKELMANN, P. K.; BECHARA, I. J. Histochemical and ultrastructural analysis of the action of naproxen on tail fin regeneration in carp (*Cyprinus carpio*). **Braz. J. of Morphol. Sciences**, Campinas, v. 24, n.1, p. 17-24, 2007.

BÖCKELMANN, P. K.; OCHANDIO, B. S.; BECHARA, I. J. Histological study of the dynamics in epidermis regeneration of the carp tail fin (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). **Braz. J. Biol.**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 217-223, 2010.

BOUVET, J. Différenciation et ultrastructure du squelette distal de la nageoire pectorale chez la truite indigene (*Salmo trutta fario L.*). I. Différenciation et ultrastructure des lépidotriches. **Arch. Anat. Micros. Morphol. Exp.**, v. 63, p. 63-79, 1974. [S.l.]

CUTRONEO, K. R.; ROKOWSKI, R.; COUNTS, D. F. Glucocorticoids and collagen synthesis: comparison of "in vivo" and cell culture studies. **Collagen Relat. Res.**, Germany West, v.1, p. 557-68, 1981.

DUFOURCQ P.; VRIZ S. The chemokine SDF-1 regulates blastema formation during zebrafish fin regeneration. **Dev. Genes Evol. Oct**, Paris, v. 216, n.10, p. 635-9, 2006.

EDELMAN, I. S. Mechanism of action of steroid hormones. **J. Steroid Biochem.**, v. 6, p. 147-59, 1975. [S.l.]

FERREIRA, A. B. H. Novo Aurélio Século XXI: o dicionário da língua portuguesa. **Nova Fronteira**, 3 ed., Rio de Janeiro, p. 673, 1999.

GARRAULT, M. Développment des fibres d'elastoidine (Actinotrichia) chez les Salmonides. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, v. 32, p. 105-37, 1936. [S.l.]

GERAUDIE, J. Initiation of the actinotrichial development of the early fin bud of the fish *Salmo*. **J. Morphol.**, Paris, v.151, p. 353-62, 1977.

GERAUDIE, J. The fine structure of the early pelvic fin bud of the trouts *Salmo gairdneri* and *S. trutta fario*. **Acta Zool.**, Paris, v. 59, p. 85-96, 1978.

GERAUDIE, J. & SINGER, M. Nerve dependent macromolecular synthesis in the pectoral fin regenerate of the fish *Fundulus*. **J. Exp. Zool.**, Paris, v. 208, p. 281-6, 1979 a.

GERAUDIE, J. & SINGER, M. Scanning electron microscopy of the normal and denervated limb regenerate in the newt *Notophthalmus viridescens* including observations on embryonic amphibian limb bud mesenchyme and blastema of fish fin regenerate. **Am. J. Anat.**, Paris, v. 162, p. 73-87, 1979 b.

GERAUDIE, J. & SINGER, M. Necessity of an adecuate nerve supply for regeneration of the amputated pectoral fin in the teleost *Fundulus*. **J. Exp. Zool.**, Paris, v. 234, p. 367-74, 1985.

GERAUDIE, J.; MONNOT, M. J.; BRULFERT, A.; FERRETTI, P. Caudal fin regeneration in wild type and *long-fin* mutant zebrafish is affected by retinoic acid. **Int. J. Dev. Biol.**, London, v. 39, p. 373-38, 1995.

GHADIALLY, E. N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 4. ed., **Butterworth-Heinemann**, Boston**,** v. II, p. 1124-1139, 1997.

GLILIOT, B. Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. **Semin. Cell Dev. Biol.** v.17, p. 492–502, 2006. [S.l.]

GOODRICH, E. S. On the dermal fin-rays of fishes-living and extinct. **J. Microsc. Sci.**, v. 47, p. 465-522, 1904. [S.l.]

GOSS, R. J.; STAGG, M. W. The regeneration of fins and fin rays in *Fundulus heteroclitus*. **J. Exp. Zool.**, v.136, p. 487-508, 1957. [S.l.]

GRASSÉ, P. Rayons des nageoires. **Traité de Zoologie**. Paris, Masson. v. 13, p. 731-747, 1958.

GROSS, J.; DUMSHA, B. Elastoidin: a two-component member of the collagen class. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 28, p. 268-70, 1958. [S.l.]

GUPTA A.; JAIN G. K.; RAGHUBIR R. A time course study for the development of an immuno compromised wound model, using hydrocortisone. **J Pharmacol Toxicol Methods.**, New York, v.41, p.183-7, 1999.

HAWS M.; BROWN R. E.; SUCHY H.; ROTH A. Vitamin A-soaked gelfoam sponges and wound healing in ster-oid- treated animals. **Ann. Plast. Surg.**, v. 32, p. 418-22, 1994. [S.l.]

HAY, E. Regeneration. **Holt, Rinehart & Winston**, New York, p.148, 1966.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. Princípios Integrados de Zoologia. Editora Guanabara Koogan S.A.11ª ed. Rio de Janeiro, p.493 – 496, 2004.

JOHNSON S. L.; WESTON J. A. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in zebrafish fin regeneration. **Genetics,** v.141, p. 1583-1595, 1995. [S.l.]

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdades de Medicina. Universidade de São Paulo. Livraria Santos Com. Imp. Ltda. 1ª Edição. São Paulo – SP, p. 48-51; 72, 1983.

KAWASHIMA, H.; OGOSE, A.; HAYAMI, T.; YAMAGIWA, H.; HATANO, H.; HOTTA, T.; ENDO, N. Effect of dexamethasone on growth inhibition and chondrogenic maturation of human chondrosarcoma. **J. Orthop. Sci.**, Niigata, v. 8, n. 3, p. 341-5, 2003.

KEMP, N. E.; PARK, I. N. Regeneration of lepidotrichia and actinotrichia in the tail fin of the teleost *Tilapia mossambica*. **Dev. Biol.**, v. 22, p. 321-42, 1970. [S.l.]

KIORTSIS, V.; TRAMPUSCH, H. A. L. Regeneration in animals and related problems. **North-Holland Publ. Comp.**, Amsterdam, p. 568, 1965.

KIVIRIKKO, K.; LAITINEN, O. Effect of cortisone on the hydroxyproline in the serum and urine of young rats. **Acta Physiol. Scand.**, v. 64, p. 356-60, 1965. [S.l.]

KRUKENBERG, C. F. Über die chemische Beschaffenheit der sog. Hornfaden von *Mustelus* und uber die Zusammensetzung der Keratinosen Hollen um die Eier von *Scyllium stellate*. **Mitt. Zool. Stat. Neapel.**, v. 6, p. 286-96, 1985. [S.l.]

LANZLNG, W.J.R. The fine structure of fins and flnrays of Tilapia mossambica (Peters). **Cell Tiss Res.**, v.173, p. 349-356, 1976. [S.l.]

LIAO, S. Cellular receptors and mechanisms of action of steroid hormones. **Int. Rev. Cytol.**, USA, v. 41, p. 87-172, 1975.

MARÍ-BEFA, M.; CARMONA, M. C.; BECERRA, J. Elastoidin turnover during tail fin regeneration in teleosts. A morphometric and radioautographic study. **Anat. Embryol.**, Málaga, v. 180, p. 465-70, 1989.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. **PATHOLOGY, Eds. E. Rubin, J. Farber**, Philadelphia, Lippincott, p. 66-95, 1988.

MATTSON, P. Regeneration. **Bobbs-Merrill Company**, Indianapolis, p.178, 1976.

MASAKI, H.; IDE, H. Regeneration potency of mouse limbs. **Dev. Growth Differ.,** v. 49, n. 2, p.89-98, Feb., 2007. [S.l.]

MIYAZAKI, Y.; TSUKAZAKI, T.; HIROTA, Y.; YONEKURA, A.; OSAKI, M.; SHINDO, H.; YAMASHITA, S. Dexamethasone inhibition of TGF beta-induced cell growth and type II collagen mRNA expression through ERK-integrated AP-1 activity in cultured rat articular chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, Nagasaki, v. 8, n. 5, p. 378-85, 2000.

MONTES, G. S.; BECERRA, J.; TOLEDO, O. M. S.; GORDILHO, M. A.; JUNQUEIRA, L. C. U. Fine structure and histochemistry of the tail fin ray in teleosts. **Histochemistry**, v. 75, p. 363-76, 1982. [S.l.]

MOSS, M. L. The biology of acellular teleosts bone. **Ann. Nat. Acad. Med. Sci.**, v.109, p. 337-50, 1963. [S.l.]

MUNEOKA, K.; BRYANT, S. V. Regeneration and development of vertebrate appendages. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v. 52, p. 177-96, 1984. [S.l.]

MUNEOKA, K.; HOLLER-DINSMORE, G.; BRYANT, S. V. Intrinsic control of regenerative loss in *Xenopus laevis* limb. **J. Exp. Zool.**, California, v. 240, p. 47-54, 1986.

MURCIANO, C.; FERNANDEZ, T. D.; DURAN, I.; MASEDA, D.; RUIZ-SANCHEZ, J.; BECERRA, J.; AKIMENTO, M. A.; MARÍ-BEFFA, M. Ray-Interray Interactions during Fin Regeneration of *Danio rerio*. **Devel. Biol.**, Málaga, v. 252, p.214–224, 2002.

MURCIANO,C.; PÉREZ-CLAROS, J.; SMITH, A.; AVARON, F.; FERNÁNDEZ, T. D.; DURÁN, I.; RUIZ-SÁNCHEZ, J.; GARCÍA, F.; BECERRA, J.; AKIMENKO, M. A.; MARÍ-BEFFA, M. Position dependence of hemiray morphogenesis during tail fin regeneration in *Danio rerio*. **Devel. Biol.**, Málaga, v. 312, p. 272–283, 2007.

NABRIT, S. M. The role of the fin rays in the regeneration in the tail-fins of fishes (in *Fundulus* and Goldfish). **Biol. Bull.**, v.56, p. 235-66, 1929. [S.l.]

NECHIPORUK, A.; KEATING, M. T. A proliferation gradient between proximal and *msxb*-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. **Development**, Boston, v. 129, p. 2607-17, 2002.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for Testing of Chemicals. OECD 203 -** Fish, Acute Toxicity Test. Adopted on July 17, 1992.

OISHI, Y.; FU, Z. W.; OHNUKI, Y.; KATO, H.; NOGUCHI, T. Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Br. J. Dermatol.**, Tokyo, v. 147, n. 5, p. 859-68, 2002.

ORD, M. G.; STOCKEN, L. A. Regeneration of urodele limbs. **Cell and tissue regeneration - a biochemical approach.** New York, cap.2, p.21-37, 1984.

ORR, R. T. Biologia dos Vertebrados. Editora Rocca, São Paulo, p. 27-31, 48-56, 63-67, 1986.

PARKER, S. Peixes. **Aventura Visual**. Editora Globo S. A., São Paulo, 63 p., 1990.

PEIXARIA RAINHA DE SANTO AMARO. São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.peixariarainhadestoamaro.com.br/index.htmltml>. Acesso em: 15 jan. 2010.

POSS, K.D.; SHEN, J.; KEATING, M. T. Induction of lef1 during zebrafish fin regeneration. **Dev. Dyn.**, Boston, v. 219, p. 282–286, 2000.

POSS, K.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK, A. Tales of Regeneration in Zebrafish. **Dev. Dyn.**, Boston, v. 226, p. 202-10, 2003.

PRENANT, M. Structure fine et croissance normale des lepidotriciles articulés chez les téléostéens. **C. R. Soc. Biol.,** Paris, v.123, p. 474-5, 1936.

PRENANT, M. Regénération des rayons osseux (lépidotriches) articulés aprés amputation des nageoires chez des Téléostéens. **C. R. Soc. Biol.,** Paris, v.127, p. 980-2, 1938.

REYNOLDS, J. E. F. Martindale – The Extra Pharmacopia. Evaluated information on the world's drugs and medicines. **Royal Pharma. Society**, 31 ed., London, p. 1042-3, 1996.

SÁNCHEZ, A. Stem cells and the planarian Schmidtea mediterranea. **C. R. Biol.**, Salt Lake City, v. 330, p. 498–503, 2007.

SANTAMARÍA, J. A.; MARÍ-BEFFA, M.; BECERRA, J. Interactions of the lepidotrichial matrix components during tail fin regeneration in teleosts. **Differentiation**, Málaga, v, 49, p. 143-50, 1992.
SANTOS-RUIZ, L.; SANTAMARÍA, J. A.; RUIZ-SÂNCHEZ, J.; BECERRA, J. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. **Dev. Dyn.,** v. 223, p. 262-72, 2002. [S.l.]

SILBERMANN, M.; VON DER MARK, K.; MAOR, G.; VAN NENXEL, M. Dexamethasone impairs growth and collagen synthesis in condylar cartilage *in vitro*. **Bone Miner**., Haifa, v. 2, p. 87-106, 1987.

SMITH, Q. T. Radioactivity of hydroxyproline from urine and collagens of normal and cortisone-treated rats. **Biochem. Pharmacol.**, v.16, p. 2171-9, 1967. [S.l.]

SU, S.; DEHNADE, F.; ZAFARULLAH, M. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by transforming growth factor-beta and dexamethasone in bovine and human articular chondrocytes. **DNA Cell Biol.**, Québec, v.15, n. 12, p. 1039-48, 1996.

TALAS D. U.; NAYCI A.; ATIS S.; POLAT A.; COMELEKOGLU U.; BAGDATOGLU C.; et al. The effects of corticosteroids on the healing of tracheal anastomoses in a rat model. **Pharmacol Res.**, Mersin, v. 45, p. 299-304, 2002.

TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMOES, M. L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, 2007.

WEIS, P.; WEIS, J. S. Effect of zinc on fin regeneration in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*, and its interaction with methylmercury. **Fish Bull.**, v. 78, p. 163-6, 1980. [S.l.]

WALLACE, H. Vertebrate limb regeneration. **John Wiley & Sons**, Chichester, 320 p., 1981.

WOYNAROVICH, E. Manual de Piscicultura. **CODEVASF- Irrigação**. 2. ed., Brasília, 69 p., 1988.

YIN, V. P.; POSS, K. D. New regulators of vertebrate appendage regeneration. **Curr. Opin. Genet. Dev.** Amsterdam, v.18, n. 4, p. 381–386, 2008.

YOSHINARI, N.; ISHIDA, T.; KUDO, A.; KAWAKAMI, A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. **Dev. Biology**, Tokyo, v. 325, p. 71–81, 2009.

ZODROW J.; TANGUAY R. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits zebrafish caudal fin regeneration. **Toxicological Sciences**, Corvallis, v.76, p. 151-161, 2003.