

c 413828

Universidade Federal do Ceará

**ESTUDO TOXICOLÓGICO E DAS ATIVIDADES
ANTIINFLAMATÓRIA, ANALGÉSICA E
ANTIANGIOGÊNICA DA CARTILAGEM DE
TUBARÃO**

Juvenia Bezerra Fontenele

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Glauce S. Barros Viana

1997



c 413828
R 800244/98
em 05/05/98



1438
616.1
1997

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R	800244 / 98
05 / 05	198

F 683 e Fontenele, Juvenia Bezerra

Estudo toxicológico e das atividades antiinflamatória, analgésica e antiangiogênica da cartilagem de tubarão / Juvenia Bezerra Fontenele. - Fortaleza, 1997.

124f. : il.

Orientadora: Glauce Socorro de Barros Viana

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Mestrado em Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Antiinflamatório. 3. Cartilagem de tubarão. I. Título.

CDD 615.1

Esta dissertação encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja de conformidade com as normas da ética científica.



Juvenia Bezerra Fontenele

Dissertação aprovada em 25 de julho de 1997

Prof. Dra. Glauce S. B. Viana

Prof. Dr. José Xavier Filho

Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Não deves suspirar por uma doutrina perfeita e sim pela perfeição de ti mesmo; a divindade está em ti, não em conceitos e livros.

Hermann Hesse

À minha mãe, por me dar segurança
para perguntar e independência para
buscar minhas próprias respostas.

Ao Lucas, que de forma inocente me faz
desejar cada vez mais ampliar minha
compreensão do viver.

AGRADECIMENTOS

Em especial à **Dra. Glauce S. Barros Viana** por me ajudar a trilhar o caminho da pesquisa, pela preciosa orientação científica e apoio na realização deste trabalho.

Ao **Prof. José Xavier Filho** por me receber em seu laboratório e por sua inestimável ajuda.

Ao **Prof. José Wilson Alencar** por sua valiosa contribuição.

Ao **Prof. Vietla S. N. Rao** pelo incentivo e pela constante doação de seus conhecimentos.

Carinhosamente, a **Laéria B. Fontenele** e ao **Carlos Augusto P. Viana** pelo incentivo e presença constante em minha vida.

Ao **Maurício P. Sales** pela doação desinteressada de seus conhecimentos bioquímicos.

Ao **Sr. Josué C. Pessoa** pela atenção e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

À **Gláucia B. Araújo** pela valiosa ajuda, infinita paciência e amizade.

À **Lusivânia C. Moura** pela colaboração em alguns experimentos, além de sua amizade.

À **Maria Vilani R. Bastos** por sua constante disponibilidade, companheirismo e preciosa amizade.

À **Ana Eclésia M. Rodrigues** pela contribuição nos experimentos, além da amizade.

À amiga **Luzia Kalyne A. M. Leal**, a quem tanto admiro, meus mais sinceros agradecimentos.

À **Geanne Matos e Flávia A. Santos** pela amizade e companheirismo diário.

À **Dra. Maria Artemiza P. A. Cardoso** pela ajuda e atenção constante.

Ao **Manoel Cláudio Patrocínio** pela ajuda na realização das fotos.

À **Silvânia Mendes** por sacrificar o curto tempo de convívio com seu filho e esposo, e me ajudar na preparação dos gráficos.

À **Angelina Medeiros** por ter sempre uma palavra amiga e sincera para oferecer quando precisei.

À **Silvandira Freire de França (Vanda)** e **Nísia R. De Souza** pela maneira sempre amável com que me ajudaram, além da amizade.

Aos amigos da Pós-graduação, do **Laboratório de Neurofarmacologia** e aos funcionários do **Departamento de Fisiologia e Farmacologia** pelo carinho a mim dedicado.

Ao **Laboratório Central do Hospital Universitário**, em particular à **Dra Zilmar Fontenele e Silva** e a **Sra. Domingas Lustosa Rodrigues**, pela colaboração na realização dos exames hematológicos.

Ao **Parque de Desenvolvimento Tecnológico da UFC (PADETEC)** pela doação da cartilagem de tubarão.

À **Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP)** e ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)** pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xviii
Resumo	xx
Abstract	xxiii

1 INTRODUÇÃO **1**

1.1 O mar como fonte de fármacos	1
1.2 Os tubarões	4
1.3 Cartilagem: Composição e usos	6
1.4 Cartilagem e Angiogênese	9
1.5 Objetivos	12
1.5.1 Gerais	12
1.5.2 Específicos	12

2 MATERIAL **13**

2.1 Cartilagem de tubarão	13
2.2 Animais	13
2.3 Reagentes e drogas	14

2.3.1	Composição de soluções, corantes e tampões	15
2.4	Material permanente e equipamentos utilizados	16
3	MÉTODOS	18
3.1	QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS	18
3.1.1	Obtenção e processamento da cartilagem de tubarão	18
3.1.2	Extração da fração hidrossolúvel da cartilagem de tubarão	18
3.1.3	Cromatografia em coluna de gel de Sephadex G-100	20
3.1.4	Determinação do conteúdo proteico	21
3.2	TOXICOLÓGICOS	21
3.2.1	Efeitos comportamentais e toxicidade aguda	21
3.2.2	Toxicidade subaguda	22
3.2.3	Toxicidade crônica	22
3.2.4	Efeitos sobre a função reprodutora	23
3.3	FARMACOLÓGICOS	24
3.3.1	Atividade antiinflamatória	24
3.3.1.1	Edema de pata induzido por carragenina em ratos	24
3.3.1.2	Edema de pata induzido por dextrano em ratos	25

3.3.1.3 Migração de neutrófilos induzida por carragenina ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) na cavidade peritoneal de ratos	25
3.3.1.4 Permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) em ratos	26
3.3.2 Atividade antiangiogênica	27
3.3.3 Atividade antinociceptiva	28
3.3.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	28
3.3.3.2 Teste da formalina	29
3.3.3.3 Teste da placa quente	30
3.4 ESTATÍSTICOS	31
4 RESULTADOS	32
4.1 BIOQUÍMICOS	32
4.1.1 Cromatografia em coluna de gel de Sephadex G-100	32
4.1.2 Determinação do conteúdo proteico	32
4.2 TOXICOLÓGICOS	35

4.2.1	Efeitos comportamentais e toxicidade aguda da cartilagem de tubarão	35
4.2.2	Toxicidade subaguda da cartilagem de tubarão	36
4.2.3	Toxicidade crônica da cartilagem de tubarão	36
4.2.4	Efeitos da cartilagem de tubarão sobre a função reprodutora	47
4.3	FARMACOLÓGICOS	51
4.3.1	Atividade antiinflamatória	51
4.3.1.1	Efeito da fração hidrossolúvel (FH) obtida da cartilagem de tubarão, sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos	51
4.3.1.2	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão, sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos	53
4.3.1.3	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina	58
4.3.1.4	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão sobre a migração de neutrófilos induzida por N-formil-metionil-leucil fenilalanina	60
4.3.1.5	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão, na permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) em ratos	63

a)	Estudo sobre o envolvimento do TNF-alfa no efeito inibitório da FH sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e serotonina em ratos	63
4.3.2	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão na angiogênese induzida por adjuvante completo de Freund e óleo de cróton em ratos	64
4.3.3	Atividade antinociceptiva	67
4.3.3.1	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos	67
a)	Estudo sobre o envolvimento do TNF-alfa na antinocicepção da fração hidrossolúvel (FH)	67
4.3.3.2	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão na nocicepção induzida por formalina em camundongos	70
a)	Estudo do papel do sistema opióide na antinocicepção da FH	70
b)	Estudo do papel do óxido nítrico na antinocicepção da FH	70

4.3.3.3	Efeito das frações semi-purificadas (FS) I e II obtidas da cromatografia da FH em coluna de gel de Sephadex G-100 na nocicepção induzida por formalina em camundongos	78
a)	Estudo do papel do óxido nítrico no efeito das frações semi-purificadas (FS) I e II no teste da formalina	78
4.3.3.4	Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão no teste da placa quente em camundongos	81
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES	100
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1- Peso corporal de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 1 g/kg/dia, durante 30 dias	37
2- Parâmetros hematológicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 1 g/kg/dia, durante 30 dias	38
3- Parâmetros bioquímicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 1 g/kg/dia, durante 30 dias	39
4- Peso corporal de ratos Wistar tratados por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia, durante 90 dias	40
5- Peso corporal de ratas Wistar tratadas por via oral durante 90 dias com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia	41
6- Parâmetros hematológicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia, durante 90 dias	43
7- Parâmetros bioquímicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia, durante 90 dias	44
8- Parâmetros hematológicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 500 mg/kg/dia, durante 90 dias	45

9-	Parâmetros bioquímicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 500 mg/kg/dia, durante 90 dias	46
10-	Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia, durante 90 dias	48
11-	Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar tratados por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia, durante 90 dias	49
12-	Estudo sobre a função reprodutora de ratas Wistar tratadas com cartilagem de tubarão (500 mg/kg/dia), durante 150 dias	50
13-	Efeito da fração hidrossolúvel extraída da cartilagem de tubarão e da indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos	54
14-	Efeito da fração hidrossolúvel extraída da cartilagem de tubarão e da ciproheptadina sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos	56
15-	Efeito da fração hidrossolúvel (FH) e da dexametasona na migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos	59
16-	Efeito da fração hidrossolúvel (FH) e da dexametasona na migração de neutrófilos induzida por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) na cavidade peritoneal de ratos	61
17-	Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão e da talidomida na permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e serotonina em ratos	65

18-	Medida da atividade antiangiogênica da fração hidrossolúvel (FH) extraída da cartilagem de tubarão	66
19-	Efeito da fração hidrossolúvel da cartilagem de tubarão e da talidomida no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos	68
20-	Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH) extraída da cartilagem de tubarão na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	71
21-	Avaliação do papel do óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	74
22-	Efeito da associação da FH, extraída da cartilagem de tubarão, com L-NAME, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	76
23-	Efeito da associação das frações semi-purificadas (FS I e FS II), obtidas da FH, com o L-NAME na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	79
24-	Efeito da fração hidrossolúvel (FH) extraída da cartilagem de tubarão e da morfina no teste da placa quente em camundongos	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1- Esquema de obtenção da fração hidrossolúvel (FH) a partir da cartilagem de tubarão	19
2- Perfil cromatográfico da fração hidrossolúvel (FH) em gel de Sephadex G-100	33
3- Peso molecular aproximado (PM) das frações semi-purificadas (FS I e FS II) obtidas a partir da cromatografia da fração hidrossolúvel (FH) em gel de Sephadex G-100	34
4- Estudo toxicológico crônico da cartilagem de tubarão em ratos	52
5- Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, e da indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos	55
6- Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, e da ciproheptadina sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos	57
7- Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão na migração de leucócitos induzida por carragenina ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) em ratos	62

8-	Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, e da talidomida na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos	69
9-	Efeito da naloxona na antinocicepção da fração hidrossolúvel (FH) e morfina no teste da formalina em camundongos	72
10-	Avaliação do papel do óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	75
11-	Efeito da associação da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão com L-NAME na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	77
12-	Efeito da associação das frações semi-purificadas (FS I e II), obtidas da FH, com o L-NAME, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	80

RESUMO

A cartilagem de tubarão vem sendo largamente utilizada como suplemento alimentar, por pessoas que apresentam algum tipo de enfermidade crônica como osteoartrite, artrite reumatóide, osteoporose, psoríase e no tratamento de alguns tipos de câncer. O presente trabalho tem como objetivo investigar a toxicidade da cartilagem de tubarão, assim como as atividades antiinflamatória e analgésica da fração hidrossolúvel (FH) obtida da cartilagem de tubarão, e a atividade analgésica das frações semi-purificadas I e II (FS I e FS II) obtidas a partir da cromatografia da FH em coluna de gel de Sephadex G-100.

O perfil cromatográfico da FH em coluna de gel de Sephadex G-100, revelou dois picos de natureza proteica, com massas de aproximadamente 101 e 1,9 KDa respectivamente.

A DL_{50} da cartilagem de tubarão, por nós utilizada, não foi determinada devido a sua baixa solubilidade em água. Entretanto, não houve mortalidade ou toxicidade aguda quando a cartilagem de tubarão foi administrada por via oral ou intraperitoneal até a dose de 2 g/kg de peso, sob forma de suspensão aquosa.

O tratamento subagudo em ratos Wistar, com cartilagem de tubarão por via oral, na dose de 1 g/kg durante 30 dias, não mostrou alterações nos parâmetros hematológicos ou na bioquímica do sangue dos animais.

O tratamento de ratos Wistar, de ambos os sexos, com cartilagem de tubarão nas doses de 100, 200 e 500 mg/kg, por via oral durante 90 dias, não revelou toxicidade crônica, nem mortes. Do mesmo modo, com relação a função reprodutora a cartilagem de tubarão não causou alterações no que se refere a concepção e/ou gestação. Contudo, alguns filhotes apresentaram deficiência no processo de desenvolvimento, detectado pela abertura palpebral incompleta.

A FH (20 mg/kg), administrada por via oral (v.o.) apresentou atividade anti-edematogênica nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina e por dextrano. Portanto, a FH parece interferir em processos inflamatórios onde é grande o número de leucócitos, como também pode apresentar uma ação estabilizadora de membranas celulares. Desta forma, passamos a investigar seus efeitos sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e serotonina em ratos. A FH (2 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($P < 0,01$) o extravasamento do corante azul de Evans induzido por serotonina. Entretanto, apenas a dose de 10 mg/kg, v.o. foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,01$) o extravasamento do corante induzido por histamina. A talidomida, administrada subcutaneamente, não foi capaz de modificar de forma significativa o efeito da FH.

A FH (10 e 20 mg/kg, v.o.) também foi testada na migração de neutrófilos induzida por carragenina ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) na cavidade peritoneal de ratos. Na dose de 10 mg/kg, v.o., apesar de ter inibido significativamente a migração de neutrófilos induzida por carragenina, a FH apresentou maior efeito inibitório sobre àquela induzida por FMLP, mostrando que além de possivelmente bloquear a liberação de fatores quimiotáticos por células residentes, também parece ser capaz de inibir, à semelhança da dexametasona, o último passo da migração neutrofilica.

No presente estudo, a FH (10 e 20 mg/kg, v.o.) também apresentou atividade inibitória significativa ($P < 0,01$) sobre a angiogênese induzida por adjuvante completo de Freund em ratos.

A atividade analgésica da FH foi avaliada em três diferentes modelos experimentais em camundongos. A FH (1 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($P < 0,05$) a nocicepção induzida pelo ácido acético e formalina. No teste da placa quente, a FH foi desprovida de efeito nas doses de 2 e 10 mg/kg, v.o. O efeito antinociceptivo da FH, no teste das contorções abdominais, não foi modificado pela

associação com a talidomida. No teste da formalina, ao contrário da morfina, o efeito da FH não foi modificado pelo pré-tratamento com a naloxona. Por outro lado, a L-arginina reverteu significativamente ($P < 0,05$) o efeito antinociceptivo da FH. O L-NAME (10 mg/kg, i.p.), quando associado à FH, promoveu uma potencialização do efeito desta última. Também no teste da formalina, a FS II (0,5 mg/kg, v.o.) mostrou um efeito inibitório significativo na 2ª fase do teste. Ambas as frações semi-purificadas promoveram uma potencialização do efeito do L-NAME, quando administradas em associação com este último.

Os resultados do presente trabalho comprovam que a cartilagem de tubarão possui atividade analgésica e antiinflamatória. A fração ativa é hidrossolúvel e de natureza proteica.

ABSTRACT

Shark cartilage has been largely used as a dietary supplement in case of chronic diseases like osteoarthritis, reumathoid arthritis, osteoporosis, psoriasis and also to treat cancer. The aim of the present work was to investigate the toxicity of the crude shark cartilage, as well as the anti-inflammatory and analgesic activities of its hydrosoluble fraction (HF). The analgesic activity of the semi-purified fractions (SF) obtained from gel filtration chromatography on Sephadex G-100 of HF was also studied.

The chromatographic profile of the HF on Sephadex G-100 revealed two peaks, I and II, rich in proteins, with molecular weights of 103 and 1,9 KDa respectively.

The LD₅₀ of shark cartilage, for us used, was not determinated because of its low solubility in water. However, no acute toxicity or mortality was observed after administration of the shark cartilage up to 2 g/kg orally or intraperitoneally as an aqueous suspension.

The subacute treatment of Wistar rats with shark cartilage 1 g/kg, orally, during 30 days did not promote alterations of the blood biochemistry or cell counting determinations.

The treatment of Wistar rats, of both sexes, with shark cartilage 100, 200 and 500 mg/kg, orally, during 90 days did not reveal any chronic toxicity or deaths. In the same way, in regard to reproductive function, shark cartilage did not alter the conception and/or gestation. Nevertheless, few litters (about 10%) exhibited deficiency in the process of development, detected by the incomplete opening of the eyelid.

The HF (20 mg/kg, p.o.) decreased the rat paw edema induced by carrageenan or dextran. Therefore, the HF seems to interfere on the inflammatory process presenting a great number of cells, and also can exert a stabilizer action on cell membranes. The next step was then to study the effects of HF on the cutaneous vascular permeability induced by histamine and serotonin in rats. The HF (2 mg/kg, p.o.) significantly decreased ($P < 0,01$) the dye extravasation induced by histamine. Thalidomide did not significantly modify the HF effect.

The HF was also tested on the neutrophil migration induced by carrageenan or N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine (FMLP) in rat peritoneal cavity. The HF (10 and 20 mg/kg, p.o.) significantly decreased neutrophil migration induced by carrageenan. However, at the same doses, HF showed a high inhibitory effect on neutrophil migration induced by FMLP. The HF seems to block the release of chemotactic factors by resident cells and similarly to dexamethasone it inhibits the last step of neutrophil migration.

In the present study, the HF (10 and 20 mg/kg, p.o.) also significantly decreased ($P < 0,01$) the angiogenesis induced by complete Freund's adjuvant in rats.

The analgesic activity of the HF was evaluated in three different models of nociception in mice. The HF (1 mg/kg, p.o.) decreased ($P < 0,05$) the nociception produced by acetic acid and formalin. In the hot plate test, the HF (2 and 10 mg/kg, p.o.) presented no effect. The antinociceptive effect of HF in the writhing test was not potentiated by thalidomide. In the formalin test, the antinociceptive effect of morphine but not that of HF was reversed by naloxone. On the other hand, L-arginine reversed ($P < 0,05$) the antinociceptive effect of HF. The L-NAME (10 mg/kg, i.p.) when associated to HF, produced an increase in the effect of HF. Also in the formalin test, the semi-purified fraction II (SF II - 0,5 mg/kg, p.o.) significantly inhibited the second phase of the test. However, both fractions (SF I and SF II) potentiaded the antinociceptive effect of L-NAME.

The present results confirm the popular use of shark cartilage as analgesic and anti-inflammatory. The active compound is hydrosoluble and presents biochemical characteristics of a protein.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 O mar como fonte de fármacos

O uso de organismos marinhos na medicina popular, é muito restrito em relação ao uso de plantas terrestres, particularmente fora do continente asiático. Devido provavelmente à sua inacessibilidade, plantas e animais marinhos têm sido usados principalmente na alimentação. Entretanto, durante os últimos 40 anos, numerosos compostos foram isolados de organismos marinhos e muitas dessas substâncias têm demonstrado atividade biológica bastante pronunciada.

A carragenina talvez seja uma das substâncias mais conhecidas entre os farmacologistas, pois é bastante utilizada no *screening* de drogas antiinflamatórias. As carrageninas são polissacarídeos sulfatados isolados de diversas espécies de algas marinhas, incluindo *Chondrus crispus*, *Euchema spinosum* e *Polyides rotundus*.

Apesar de poderem ser sintetizadas, algumas prostaglandinas (PG) podem ser isoladas de algas marinhas. A fonte natural mais rica em PGA_2 e seus derivados, conhecida até o momento é o coral *Plexaura homomalla*, encontrado em áreas do Caribe. As PGE_2 e PGF_{2a} também podem ser obtidas de algas vermelhas pertencentes ao gênero *Gracilaria* (BLUNDEN, 1996).

Uma série de novos compostos foram isolados da cianobactéria marinha *Rivularia firma*. Um dos principais compostos isolados dessa cianobactéria, de natureza indólica, mostrou atividade inibitória do edema de pata induzido por carragenina e caolin em ratos, além de ter apresentado ação sobre o sistema nervoso central (BLUNDEN, 1996).

As lectinas têm recebido bastante atenção nos últimos anos. São glicoproteínas, encontradas também em organismos marinhos. Provavelmente as lectinas mais conhecidas, provenientes de fontes marinhas, são as potentes hemaglutininas obtidas do caranguejo *Limulus polyphemus*, como a limulina. É também desse caranguejo que se extrai uma substância que é usada para detectar a presença de endotoxinas, por exemplo, em preparações farmacêuticas e na água.

Dois agentes antimitóticos e antimutagênicos, o avarol e a avarona, extraídos da esponja *Disidea avara*, têm demonstrado um efeito inibitório dose-dependente sobre a replicação do agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) *in vitro*. Por essa razão, esses compostos podem ter um uso potencial no tratamento da AIDS (SARIN et al., 1987). Outros compostos obtidos de algas do gênero *Laminaria*, têm sido estudados contra o vírus da AIDS e *herpes simplex*.

Muitas substâncias isoladas de organismos marinhos têm sido testadas na pesquisa de compostos antitumorais e, algumas têm demonstrado possuir tais atividades. Dentre esses compostos, talvez os mais conhecidos sejam um grupo de lactonas cíclicas denominadas briostatinas. As briostatinas foram isoladas primariamente da *Bugula neritina*, embora também possam ser extraídas de algumas esponjas (BLUNDEN, 1996). A briostatina-1 mostrou efeito inibitório sobre a produção de tumores por ésteres de forbol, através de um mecanismo que envolve a ativação da proteína kinase C (HENNINGS et al., 1987; PARKER et al. 1988; GSCHWENDT et al., 1988). MAY et al. (1987) sugerem que as briostatinas podem ser úteis clinicamente no tratamento de estados de falha da medula óssea por apresentarem atividade antineoplásica, além de estimularem células hematopoiéticas humanas normais. Foi também demonstrado que a briostatina-1 e a briostatina-2 são capazes de induzir a expressão da interleucina-2 (IL-2) em linfócitos T humanos com concomitante resposta proliferativa (HESS et al., 1988).

Outro grupo importante de compostos de origem marinha com atividade antitumoral, são as dolastatinas, isoladas da *Dolabella auricularia*. Pesquisas têm demonstrado que a dolastatina-10 possui uma potente atividade antineoplásica (BLUNDEN, G., 1996).

Microrganismos marinhos, como fungos e bactérias, também têm sido estudados como fonte de substâncias biologicamente ativas. O fungo *Cephalosporium acremonium*, a primeira fonte de cefalosporinas, foi isolado em 1948 por Brotzu, do mar, perto de uma saída de esgoto na costa da Sardenha. Com o isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C, foi possível produzir compostos semi-sintéticos de atividade antibacteriana muito maior, como é o caso da cefalotina, que é bastante útil principalmente nos casos em que o organismo causador da infecção é resistente a benzilpenicilina e a ampicilina (MANDELL & PETRI, 1996).

A alga *Digenia simplex* tem sido utilizada como anti-helmíntico por centenas de anos, especialmente na medicina popular do Japão. Sua substância ativa, o ácido alfa-caínico possui um espectro de atividade muito amplo. Estudos recentes mostram que não só as algas, mas também as esponjas e uma espécie de pepino marinho, podem ser fonte de compostos antiparasitários (BLUNDEN, 1996).

Extratos de diversas algas marinhas contêm vitamina C, ácido fólico, niacina, entre outras vitaminas, entretanto são muitas as dificuldades encontradas na separação das vitaminas dos numerosos princípios tóxicos também produzidos por estas algas. Os fígados de peixes também são bastante conhecidos como fonte de vitaminas A e D.

Além de compostos com propriedades farmacológicas, são muitas as toxinas encontradas em seres de vida marinha: irritantes, estimulantes e depressores do sistema nervoso central, substâncias hemolíticas e venenos protoplasmáticos. Duas potentes toxinas bastante conhecidas e estudadas são a saxitoxina e a tetrodotoxina. Ambas causam potente bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes (JANISZEWSKI, 1990). A saxitoxina é produzida por moluscos de várias espécies

como *Alexandrium tamarense*, *A. catenellum*, *Gymnodinium catenatum* e *Ptychodiscus brevis*. Outra interessante toxina é a Iofotoxina, uma lactona diterpênica, isolada de um coral do gênero *Lophogorgia*, que produz um bloqueio pós-sináptico irreversível da junção neuromuscular (BLUNDEN, 1996).

Embora numerosos compostos isolados de organismos marinhos tenham demonstrado atividades biológicas diversas, as dificuldades encontradas na coleta e cultura de grandes quantidades destes organismos tem desencorajado as companhias farmacêuticas a desenvolver drogas a partir destes compostos.

1.2 Os tubarões

Os tubarões estão entre os vertebrados mais primitivos que habitam a Terra. Duzentos milhões de anos antes dos dinossauros dominarem a terra, os tubarões já cruzavam os mares. Acredita-se que essas criaturas tenham sobrevivido por 400 milhões de anos devido à sua estrutura cartilaginosa, seus sentidos e especialmente à sua resistência a doenças (LANE & COMAC, 1993; HOLDEN, 1994).

Os órgãos dos sentidos dos tubarões são incrivelmente desenvolvidos, sendo que o olfato é um dos mais importantes. Dois terços do peso de seus cérebros são dedicados exclusivamente a função olfatória. Os tubarões são capazes de sentir o cheiro de uma gota de sangue em um milhão de galões de água. Esse fato combinado à função auditiva dos tubarões, os fazem um dos mais perfeitos predadores.

Existem aproximadamente 350 espécies de peixes formados exclusivamente por tecidos cartilagosos, como é o caso dos tubarões. Habitam principalmente em águas de regiões tropicais e subtropicais, mas são encontrados em todos os oceanos, exceto no Antártico. As espécies variam largamente em comportamento, modo de reprodução e tamanho. A maior delas, *Squaliolus laticaudas* chega a ter 15 metros de comprimento, enquanto a menor delas *Rhinocodum tupus* varia entre 15 e 20

centímetros de comprimento. As espécies mais abundantes no litoral norte e nordeste do Brasil são: *Carcharhinus falciformis*, *Carcharhinus porosus*, *Galeocerdo currier*, *Ginglymostoma cirratum* e *Sphyrna mokarrom*.

O fato dos tubarões possuírem um esqueleto exclusivamente cartilaginoso e um sistema imune forte e efetivo, chamou a atenção de pesquisadores que, em meados dos anos 60, descobriram nos tubarões uma grande quantidade de um tipo peculiar de imunoglobulina circulante (LANE & COMAC, 1993). Além disso, está descrito na literatura que tubarões possuem receptores para células T, assim como proteínas pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade (HOLDEN, 1994).

A principal utilização dos tubarões pelo homem é na alimentação. Os chineses têm feito uso, por incontáveis anos, de grandes quantidades diárias de sopa da cartilagem de barbatana de tubarão, por acreditarem que esta é afrodisíaca e um elixir da juventude. Além disso, durante a II Guerra Mundial, o fígado de tubarões, entre outros peixes, era tido como uma das principais fontes de vitamina A. Depois da guerra, a vitamina A foi sintetizada, e o uso do óleo de fígado de tubarões, como fonte desta vitamina, tornou-se obsoleto (LANE & COMAC, 1993).

Além da cartilagem e do óleo de fígado de tubarão, muitas pessoas fazem uso de sua carne na alimentação. Médicos noruegueses acreditam que a carne de tubarões contém substâncias que podem ser úteis na proteção contra os efeitos nocivos da radiação, além de ser útil contra o câncer (WALKER, 1991).

A diferença mais óbvia existente entre o esqueleto dos tubarões e outros seres vertebrados, como por exemplo o homem, é a ausência de ossos. A cartilagem representa cerca de 6% do peso bruto dos tubarões, enquanto na maioria dos mamíferos essa quantidade não chega a 1% (MOSS, 1977). No homem, por exemplo, a cartilagem é encontrada nas orelhas, nariz, nas articulações, nas extremidades dos ossos, e entre os segmentos da coluna.

1.3 Cartilagem - composição e usos

A cartilagem é um tecido denso, que precede a formação do esqueleto ósseo da maioria dos mamíferos. No tecido cartilaginoso, os nutrientes são difundidos pela matriz de gel que une os anéis de cartilagem. Enquanto os ossos são compostos primariamente de sais de cálcio e fósforo, possuem canais que permitem a passagem de vasos sanguíneos e fibras nervosas, a cartilagem não contém usualmente grandes quantidades desses sais, nem possui vasos sanguíneos ou nervos.

A análise química da cartilagem de tubarões brasileiros, produzida em Fortaleza, Ceará, revelou a presença de 41% de proteínas, 48% de cinzas, 2,3% de carboidratos, 5,6% de água, aproximadamente 0,1% fibras e 0,5% de gorduras (ALENCAR et al., 1995).

A cartilagem é um complexo de mucopolissacarídeos ácidos e proteínas. Contém colágeno e glicosaminoglicanos, incluindo sulfato de condroitina A, B e C. O colágeno é uma família de proteínas, que tem uma grande força de tensão. Foram caracterizados até o momento, cinco tipos de colágeno, com diferentes distribuições teciduais. O colágeno tipo I, o mais abundante, é o principal componente fibroso da pele, tendões, ossos e córnea. O tipo II encontra-se na cartilagem, disco intervertebral e humor vítreo; e o tipo III está presente na pele fetal, sistema cardiovascular e fibras reticulares. O tipo IV encontra-se principalmente na membrana basal, enquanto o tipo V é abundante na placenta e na pele.

A unidade estrutural básica do colágeno é o tropocolágeno, que consiste em três filamentos, cada um com cerca de 1000 aminoácidos. O colágeno tem uma composição e uma sequência de aminoácidos invulgar. A proporção de radicais de glicina em todas as moléculas de colágeno é de quase um terço, o que é extremamente alto para uma proteína. A prolina também está presente em um grau muito maior no colágeno do que na maioria das outras proteínas. Além disso, o colágeno contém dois aminoácidos que são raramente encontrados em outras

proteínas: a hidroxilisina e a hidroxiprolina. Na sequência de aminoácidos do colágeno, quase todo terceiro aminoácido é a glicina. Ademais, a sequência glicina-prolina-hidroxiprolina é repetida com muita frequência (STRYER, 1992).

Os mucopolissacarídeos são substâncias gelatinosas de alto peso molecular, que ao mesmo tempo lubrificam e servem de cimento ligante. O sulfato de condroitina A e o C são os mucopolissacarídeos mais abundantes no corpo e são importantes componentes estruturais de cartilagens, ossos, tendões e tecido conjuntivo. O sulfato de condroitina B está presente no tecido conjuntivo e é abundante na pele, parede de artérias e válvulas cardíacas (CAPLAN, 1984; HOOK et al., 1984; STRYER, 1992).

ONODERA et al. (1996) isolaram da cartilagem articular bovina, uma proteína de alto peso molecular. Essa proteína de 320 KDa, após redução com mercaptoetanol, exibiu um trímero de 105 KDa em eletroforese de gel de poliácridamida - dodecil sulfato de sódio. Alto conteúdo de ácido aspártico, mas não de hidroxilisina e hidroxiprolina, foi detectado indicando que a proteína não era o colágeno.

Análises realizadas em tecidos cartilagosos jovens revelaram a presença de baixos teores dos ácidos linoleico e araquidônico (ácidos graxos poliinsaturados) e, a presença de altos teores do ácido 5, 8, 11-cis-icosanotrienoico (ácido de Mead), contrariamente ao que ocorre em tecidos não cartilagosos (ADIKSSON et al., 1991). Sabe-se que a deficiência em ácidos graxos poliinsaturados pode suprimir respostas inflamatórias, como nas doenças artríticas (BOMBARIERI et al., 1981), além de ter um papel na supressão da rejeição de transplantes (SCHREINER et al., 1988). Pesquisas sugerem que os altos teores do ácido 5, 8, 11-cis-icosanotrienoico possam desempenhar um papel importante na proteção da cartilagem contra doenças inflamatórias pois, a ausência de uma dupla ligação na posição 14 na sua estrutura, impede que o mesmo seja um substrato para a cicloxigenase, enzima responsável pela síntese de prostaglandinas (BOMBARIERI et al., 1981).

A cartilagem tem sido usada desde os anos 50 na promoção da cicatrização (LATTES et al., 1956; PRUDDEN et al., 1957, 1958, 1959). PRUDDEN et al. (1957) demonstraram que o pó da cartilagem traqueal bovina, administrado localmente, possui uma potência 20% maior na cicatrização que outras substâncias tais como a metionina, administrada sistemicamente. A fração específica da cartilagem responsável por esse efeito não foi identificada, embora se saiba que não é o sulfato de condroitina.

Estudos posteriores foram feitos, mostrando que a cartilagem traqueal de bezerros também foi eficaz na aceleração da cicatrização em voluntários humanos. Da mesma forma, a cartilagem de tubarão mostrou ser tão efetiva quanto a cartilagem bovina, indicando que o fator que promove a cicatrização de feridas pode estar presente em diversas espécies animais (PRUDDEN & ALLEN, 1965).

HOUCK e VICKERS (1962) demonstraram que o pó de cartilagem tem atividade antiinflamatória, além de agir na aceleração do reparo tecidual. Devido ao seu efeito antiinflamatório, suas propriedades antialérgicas e antiangiogênicas, a cartilagem vem sendo usada por via oral ou parenteral (PRUDDEN & BALASSA, 1974) no tratamento da osteoartrite (RAUIS, 1991), alergias cutâneas agudas e crônicas, psoríase, artrite reumatóide, colite ulcerativa, enterite regional, esclerose sistêmica progressiva, retinopatia diabética, glaucoma neurovascular, câncer e dor associada ao sarcoma de Kaposi (WALKER, 1991).

O sulfato de condroitina C, obtido da cartilagem de tubarão, mostrou ser eficaz na supressão da aterogênese em coelhos hipercolesteromizados (MATSUSHIMA et al., 1987). Nesse trabalho, os autores sugerem que o papel do sulfato de condroitina C na aterosclerose, pode ser devido a um mecanismo que envolve a redução da concentração do colesterol LDL no plasma e por afetar o metabolismo dos glicosaminoglicanos no tecido arterial. Além do sulfato de condroitina C, o sulfato de condroitina A também tem demonstrado ser eficaz na supressão da aterosclerose (MORRISON et al., 1966; MORRISON, 1971; DAY et al., 1975).

1.4 Cartilagem e angiogênese

O termo angiogênese foi criado em 1935 para descrever a formação de novos vasos na placenta durante a gravidez (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987). No adulto normal, a angiogênese ocorre durante a ovulação, gestação, na cicatrização de feridas e na resolução de fraturas.

Em meados dos anos 60, muitos estudos foram iniciados tentando relacionar a angiogênese com o crescimento de tumores (FOLKMAN et al., 1963; 1966; GIMBRONE et al., 1969). Com base nesses estudos, foi publicada uma hipótese acerca da importância da angiogênese sobre o crescimento tumoral (FOLKMAN, 1971). Nesse trabalho, o autor teoriza que drogas que sejam capazes de inibir o desenvolvimento de vasos sanguíneos, necessários à nutrição dos tumores, podem ter um potencial terapêutico bastante promissor no tratamento de alguns tipos de câncer.

O isolamento do primeiro fator angiogênico de tumores, foi descrito no início dos anos 70 (FOLKMAN et al., 1971). A partir de então, diversos métodos foram desenvolvidos para o isolamento e estudo desses fatores, assim como para o entendimento dos passos que compõem a angiogênese.

A literatura descreve uma grande variedade de fatores angiogênicos. Nos últimos anos, muitos desses fatores foram purificados, suas sequências de aminoácidos determinadas e seus genes clonados. Esses polipeptídios incluem fatores de crescimento de fibroblastos ácidos e básicos, a angiogenina e fatores transformadores de crescimento alfa e beta (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987).

A angiogênese fisiológica é fundamental para reprodução, desenvolvimento e reparo tecidual. Em contraste, muitas condições patológicas como câncer, aterosclerose e retinopatia diabética são caracterizadas por um tipo persistente e anormal de angiogênese. Com a aceitação da teoria de FOLKMAN (1971) sobre a

angiogênese, muitos compostos têm sido pesquisados na esperança de se encontrar a cura de uma das moléstias que mais mata no mundo - o câncer.

O fato da cartilagem ser um tecido avascular, chamou a atenção de cientistas, que nos anos 70, decidiram procurar, neste tecido, inibidores da angiogênese. Um fator extraído da cartilagem de bezerros e purificado através de cromatografia de afinidade, mostrou efeito inibitório da proliferação vascular induzida por um tipo de carcinoma na córnea de coelhos (LANGER et al., 1976). A análise dessa fração mostrou a presença de diferentes proteínas, sendo que a maior delas apresentou uma massa de cerca de 16 KDa. A fração também demonstrou atividade inibitória sobre proteases.

LEE e LANGER (1983) demonstraram que a cartilagem de tubarão continha uma substância que inibe a neovascularização em tumores sólidos, com conseqüente restrição de seu crescimento. À semelhança da fração obtida da cartilagem bovina, o extrato obtido a partir da cartilagem de tubarões também exibiu atividade inibitória sobre proteases, além de inibir a colagenase tipo I da córnea de coelhos.

Outro inibidor da angiogênese foi obtido da cartilagem de tubarão de procedência japonesa (OIKAWA et al., 1990). Essas frações inibiram significativamente o crescimento tumoral e a angiogênese embrionária, sendo que as maiores atividades inibitórias concentraram-se nas frações de massas de aproximadamente 103 a 104 KDa.

Uma proteína, obtida da cartilagem bovina, foi purificada através de precipitação e cromatografia em coluna. A sequência do grupamento amino terminal foi determinada, e revelou que essa proteína difere do inibidor da colagenase humana obtida de fluido amniótico, em apenas dois aminoácidos nas posições 17 e 27 dentre os 28 aminoácidos da sequência amino terminal analisada (MOSES et al., 1990). Essa proteína também demonstrou atividade inibitória da angiogênese *in vivo* e inibição da proliferação de células endoteliais, além de ser também um inibidor da colagenase de mamíferos.

Tanto a cartilagem de tubarão quanto a bovina possuem substâncias que inibem a angiogênese. A cartilagem de tubarão também possui muitas das atividades bioquímicas mostradas pela bovina, incluindo atividade inibitória contra proteases como a tripsina, quimiotripsina e plasmina (ROUGHLEY et al., 1978), contra colagenase tipo I (LEE & LANGER, 1983), além de atividade lisossomal.

Um dos passos chaves da angiogênese é a produção, por células endoteliais, de proteases e metaloproteinases (colagenases, gelatinases, etc.) que degradam a membrana basal e permitem a invasão endotelial da matriz extracelular (FAN et al., 1995). Acredita-se que a cartilagem de tubarão e a cartilagem bovina, possivelmente exercam seus efeitos sobre a angiogênese através da inibição dessas enzimas (LANGER et al., 1976; LEE & LANGER, 1983; MOSES et al., 1990).

Em 1985, foi feito um estudo sobre o uso da cartilagem bovina no tratamento de trinta e um pacientes com câncer, sendo que a maioria apresentava um estágio bastante avançado da doença (PRUDDEN, 1985). Nesse estudo, apenas 9% dos pacientes não responderam ao tratamento e 35% mostraram uma regressão total do tumor.

Nos últimos anos, a cartilagem obtida de tubarões, devidamente processada, vem sendo utilizada como suplemento alimentar por pessoas que apresentam algum tipo de enfermidade crônica, dentre as quais se incluem várias formas de câncer, osteoporose, artrose, artrite reumatóide e psoríase. Entretanto, pouco se tem divulgado a respeito de suas propriedades farmacológicas, sua toxicidade e seus constituintes químicos.

1.5 Objetivos

1.5.1 Gerais

O presente trabalho tem como objetivo, estudar a toxicidade pré-clínica da cartilagem de tubarão.

1.5.2 Específicos

1^o) Obter a fração hidrossolúvel (FH) a partir da cartilagem de tubarão, assim como as frações semi-purificadas (FS I e II) provenientes da cromatografia da FH em gel de Sephadex G-100.

2^o) Avaliar as atividades antiinflamatória, analgésica e antiangiogênica da fração hidrossolúvel (FH) e frações semi-purificadas (FS I e II).

2- MATERIAL

2.1 Cartilagem de tubarão

A cartilagem de tubarão, marca Selachii[®]; oriunda das espécies *Carcharhinus falciformes*, *Carcharhinus porosus*, *Galeocerdo currier*, *Ginglymostoma cirratum* e *Sphyrna mokarrom*, capturados no litoral norte e nordeste do Brasil, nos foi gentilmente cedida pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal do Ceará - PADETEC.

2.2 Animais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss-Webster, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 20 e 30 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em caixas plásticas, à temperatura ambiente, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas e livre acesso à ração e água.

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, adultos, de ambos os sexos, pesando de 100 a 250 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram mantidos em caixas plásticas, à temperatura ambiente, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas e livre acesso à ração e água, no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

2.3 Reagentes e Drogas

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, e encontram-se abaixo relacionados com suas respectivas procedências:

PRODUTO	PROCEDÊNCIA
- Ácido acético glacial	Grupo Química, Brasil
- Ácido clorídrico	Merck, Alemanha
- Ácido sulfúrico	Reagen, Brasil
- Adjuvante completo de Freund	Sigma, U.S.A.
- Albumina sérica bovina	Sigma, U.S.A.
- Anidrase carbônica	Sigma, U.S.A.
- Azul de dextrano	Sigma, U.S.A.
- Azul de Evans	Sigma, U.S.A.
- Bicarbonato de amônio	Merck, Alemanha
- Carbonato de sódio	Grupo Química, Brasil
- Carmina	Sigma, U.S.A.
- Carragenina (λ)	Sigma, U.S.A.
- Ciproheptadina	Sigma, U.S.A.
- Citocromo C	Sigma, U.S.A.
- Corante Panótico Rápido	LABORCLIN, Brasil
- Dexametasona	CEME, Brasil
- Dextrano	Sigma, U.S.A.
- Diluidor de hemoglobina -DA 500	CELM, Brasil
- Éter etílico	VETEC, Brasil
- Follin ciocalteau (Reativo para fenol)	QEEL, Brasil
- Formaldeído	Synth, Brasil
- Formamida	VETEC, Brasil
- Heparina 5.000 UI	Roche, Brasil

- Hidróxido de sódio	Reagen, Brasil
- Histamina	Sigma, U.S.A.
- Indometacina	Sigma, U.S.A.
- Kits para determinação manual da bioquímica do sangue	Labtest, Brasil
- Kits para determinação automatizada de padrões sanguíneos	Bayer, U.S.A.
- L-arginina	Sigma, U.S.A.
- L-NAME (N ω -nitro-L-arginina-metil-ester)	Sigma, U.S.A.
- Metanol	Synth, Brasil
- Naloxona	Sigma, U.S.A.
- N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP)	Sigma, U.S.A.
- Óleo de cróton	Sigma, U.S.A.
- Sephadex G-100	Sigma, U.S.A.
- Serotonina (5-hidroxitriptamina)	Sigma, U.S.A.
- Sulfato de cobre	VETEC, Brasil
- Sulfato de morfina (Dimorf)	Cristália, Brasil
- Talidomida	CEME, Brasil

2.3.1 Composição de soluções, corantes e tampões

- Corante de Turk

- Ácido acético glacial (15 ml)	(Grupo Química, Brasil)
- Violeta de genciana à 2 % (2 ml)	(Reagen, Brasil)
- Água destilada (500 ml)	

- Solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4

- Cloreto de sódio (8 g) (Reagen, Brasil)
- Cloreto de potássio (0,2 g) (Reagen, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico (1,15 g) (Reagen, Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico (0,2 g) (Reagen, Brasil)
- Água deionizada (q.s.p. 1000 ml)

- Soluções para dosagem de proteínas

- Solução A: Na_2CO_3 a 2 % em NaOH 0,1M;
- Solução B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a 1 %;
- Solução C: 24 ml da solução A misturados a 1 ml da solução B no momento do uso;
- Solução D: Reagente de Follin ciocalteau-fenol em água destilada (1 : 1), misturados no momento do uso;
- Solução padrão: Albumina sérica bovina 1 mg/ml.

2.4 Material permanente e equipamentos utilizados

- Agitador de tubos Mod. 251-FANEM, Brasil
- Autoclave Soc. FABBE Ltda., Brasil
- Balança analítica Metler e Marte, Brasil
- Centrífuga Mod. 215-FANEM, Brasil
- Colunas cromatográficas K 15 Pharmacia Fine Chemicals, Suécia
- Contador manual de células GEMMY Ind. Corp., Taiwan
- Contador automático de células Mod. CC 530-CELM, Brasil

- Determinador automático de padrões
sanguíneos

Technicon H-1E-Bayer, U.S.A.

- Espectrofotômetro

DU[®] 640 B-Beckman, U.S.A.

- Liofilizador

Metal-Lux, Brasil

- Microscópio óptico

Mod. YS2-T-Nikon, Japão

- pHmetro

B 374 Micronal, Brasil

- Pletismógrafo

cat. n° 7150-Ugo Basile, Itália

3 - MÉTODOS

3.1 QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

3.1.1 Obtenção e processamento da cartilagem de tubarão

A cartilagem de tubarão (Selachii[®]), foi obtida a partir da coluna cervical de tubarões das espécies *Galeocerdo currier*, *Carcharinus porosus*, *Sphyrna mokarrom*, *Carcharinus falciformis* e *Ginglimostoma cirratum*, capturados principalmente através da pesca artesanal, no norte e nordeste do Brasil. A mesma, foi processada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico da UFC - PADETEC, constando das seguintes etapas:

- Eliminação, por meios mecânicos, do material não cartilaginoso;
- Secagem em estufa com circulação forçada de ar;
- Pulverização em moinho de aço inoxidável provido com malha 50 ABNT;
- Esterilização com lâmpada UV.

3.2.1 Extração da fração hidrossolúvel da cartilagem de tubarão

Dez gramas da cartilagem de tubarão em pó, foram extraídas em 250 ml de água bidestilada por 2 horas e centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante, contendo o material hidrossolúvel, foi então liofilizado e denominado fração hidrossolúvel (Figura 1).

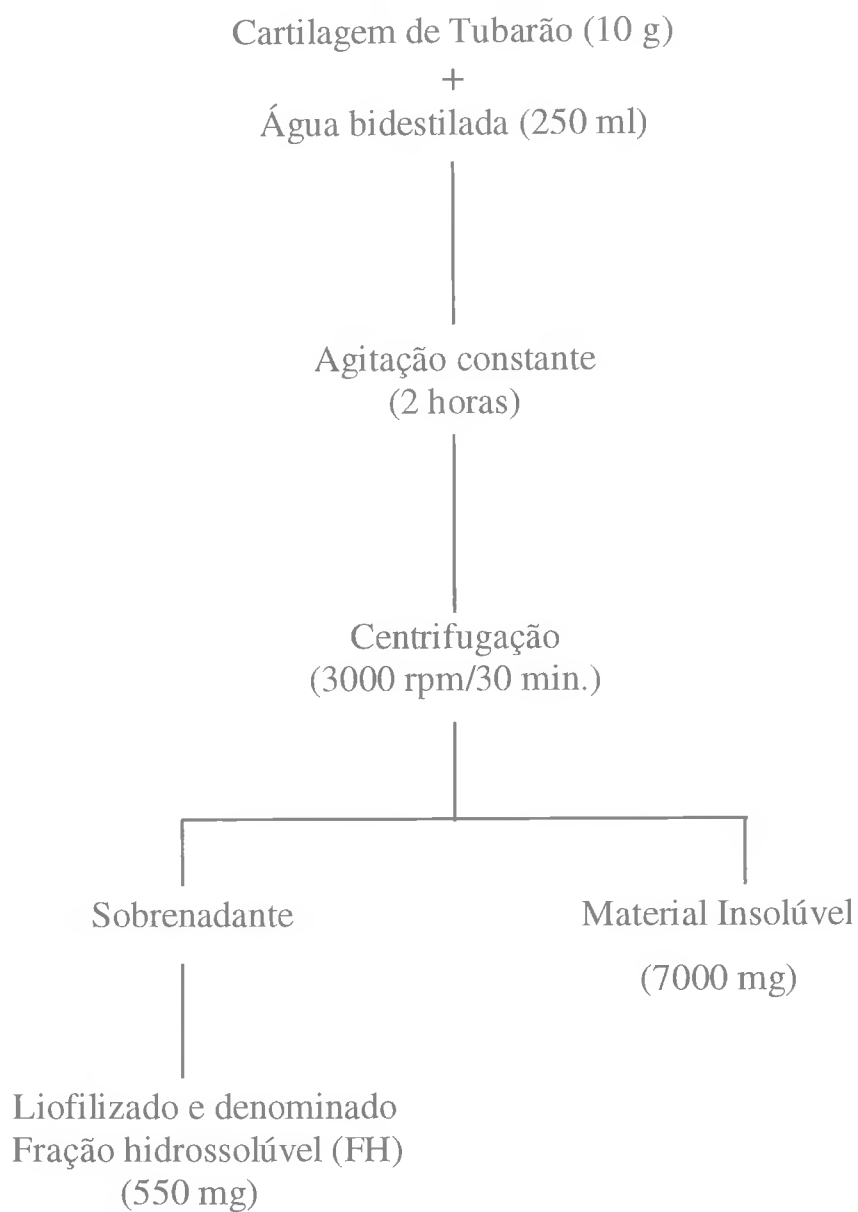


Figura 1 - Esquema de obtenção da fração hidrossolúvel (FH) a partir da cartilagem de tubarão

3.1.3 Cromatografia em coluna de gel de Sephadex G-100

A cromatografia em coluna de gel de Sephadex G-100 foi realizada segundo o método descrito por ANDREWS (1970). Para o preparo do gel, o pó de Sephadex (15 g) foi adicionado à água bidestilada (500 ml) e em seguida deixado em repouso por 24 h para que houvesse o entumescimento do gel. Decorrido este período, as partículas mais finas foram decantadas e o gel lavado várias vezes com água bidestilada. À última lavagem foi adicionado tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0, na proporção de 1 : 1 (volume do tampão : volume da suspensão do gel). As colunas cromatográficas de dimensões 1,5 x 90 cm, foram preenchidas em um terço de suas alturas, com tampão e compactadas por gravidade com o gel. As colunas foram lavadas com solução tampão, com pelo menos o dobro de seus volumes, utilizando-se um fluxo de 60 ml/hora.

Após a compactação das colunas, determinamos o volume de exclusão (V_o), pela aplicação de 1,5 ml de uma solução de azul de dextrano a 0,2 %. Teoricamente, o valor do V_o é aproximadamente 35 % do volume total da coluna, quando esta é apropriadamente compactada e as partículas do gel têm diâmetro uniforme (SUSSKIND, 1966).

Para determinação dos pesos moleculares das substâncias em estudo, as seguintes proteínas foram usadas como padrões: albumina sérica bovina (PM 66 KDa), anidrase carbônica (PM 29 KDa) e citocromo C (PM 12,4 KDa). Todas as proteínas foram aplicadas na concentração de 2 mg/ml, em volume de 1,5 ml, dissolvidas no tampão de eluição.

A fração hidrossolúvel (FH) extraída da cartilagem de tubarão (200 mg/ml) foi aplicada nas colunas, num volume de 1,5 ml. As frações obtidas foram coletadas em um volume de 2 ml por tubo e, o conteúdo de proteína existente foi detectado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 280 nm. Posteriormente, as frações foram liofilizadas e denominadas frações semi-purificadas (FS).

3.1.4 Determinação do conteúdo proteico

A concentração de proteínas foi determinada na fração hidrossolúvel, assim como nas frações obtidas a partir da cromatografia, pelo método descrito por LOWRY (1951). Esse método baseia-se em duas reações de formação de cor. Primeiramente é feita uma reação biureto de baixa eficiência, na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Essa cor é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa do ensaio. Posteriormente, o método emprega uma mistura complexa de sais orgânicos (Folin-Ciocalteu), que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano, livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 750 nm.

3.2 TOXICOLÓGICOS

3.2.1 Efeitos comportamentais e toxicidade aguda

Foram utilizados camundongos Swiss (20 - 30 g), escolhidos aleatoriamente, separados em grupos de 10 animais cada e mantidos previamente em jejum por 12 horas. A cartilagem de tubarão (CT) foi administrada por via oral e via intraperitoneal, nas doses de 1 e 2 g/kg, num volume de 10 e 20 ml/kg de peso respectivamente. Todos os grupos foram observados durante 120 minutos após administração da CT, e em intervalos previamente estabelecidos durante 72 horas.

Os parâmetros observados foram: motilidade, frequência respiratória, piloereção, movimentos estereotipados, tremores, ereção e tremor da cauda, convulsão, sedação, catatonía, ptose palpebral, analgesia, resposta ao tato, urina (aumento, diminuição e coloração), diarreia, contorção, agressividade, grunido, coma e morte.

3.2.2 Toxicidade Subaguda

Foram utilizadas ratas Wistar (180 - 220 g), escolhidas aleatoriamente e divididas em grupos de 10 animais cada. Os animais foram tratados diariamente com a cartilagem de tubarão 1 g/kg, por via oral, durante 30 dias, num volume de 10 ml/kg de peso. O grupo controle recebeu um volume correspondente de água destilada. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram analisados no início e final do tratamento. Para determinação dos parâmetros bioquímicos, foram usados métodos manuais comumente utilizados nos laboratórios de análises clínicas, e a determinação dos parâmetros hematológicos foi feita de forma automatizada. Os animais foram observados diariamente, evidenciando-se possíveis alterações comportamentais e alguma manifestação tóxica, além de serem pesados semanalmente, no decorrer do tratamento.

3.2.3 Toxicidade Crônica

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos (100 - 200 g), escolhidos ao acaso e divididos em grupos de 7 a 10 animais cada. Os animais foram tratados diariamente com a cartilagem de tubarão nas doses de 100, 200 e 500 mg/kg, por via oral (v.o), durante 90 dias, num volume de 10 ml/kg de peso. Os grupo controle recebeu um volume correspondente de água destilada.

O acompanhamento dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais controles e tratados, foi feito no início e final do tratamento. A determinação desses parâmetros foi feita como referido anteriormente. Os animais foram observados diariamente para possíveis alterações no comportamento ou manifestações tóxicas. O peso corporal dos mesmos foi registrado semanalmente, durante os 90 dias de tratamento.

3.2.4 Efeitos sobre a função reprodutora

Foram utilizadas ratas Wistar (120 - 180 g), escolhidas ao acaso e divididas em grupos de 6 animais cada. Os animais foram tratados diariamente com cartilagem de tubarão (CT 500 mg/kg), por via oral (v.o), durante 150 dias, num volume 10 ml/kg de peso. Os animais foram tratados antes, durante e após o acasalamento. O controle recebeu um volume correspondente de água destilada. As ratas foram acasaladas, observando-se o ciclo estral.

Após a gestação foram observados o número de filhotes nascidos vivos, os natimortos, o peso corporal dos mesmos e as possíveis alterações antes e após o desmame. Esses filhotes, após atingirem a idade adulta, também foram acasalados formando-se grupos de fêmeas e machos provenientes das mães tratadas com CT (500 mg/kg, v.o.) por 150 dias e, grupos de fêmeas provenientes das mães tratadas e machos provenientes de mães sem tratamento. Os mesmos parâmetros descritos anteriormente foram observados após o nascimento dos filhotes.

3.3 FARMACOLÓGICOS

3.3.1 Atividade antiinflamatória

3.3.1.1 Edema de pata induzido por carragenina em ratos

O modelo de edema de pata induzido por carragenina foi realizado segundo o método de WINTER et al., (1962). Para tanto, foram utilizados ratos Wistar (150 - 200 g), escolhidos aleatoriamente. Suas patas direitas traseiras foram estendidas e introduzidas, em pletismógrafo, até a borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar. O volume (ml) de líquido deslocado (V_I), foi então registrado em um monitor digital.

Os animais foram tratados por via oral (v.o.), com a fração hidrossolúvel (FH) (10 e 20 mg/kg) e indometacina (2 mg/kg), num volume de 10 ml/kg de peso. O grupo controle recebeu um volume equivalente de veículo (Bicarbonato de sódio 5%). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar de 0,1 ml de uma solução de carragenina a 1% p/v. O volume das patas foi medido nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção de carragenina. O volume do edema (V_E), decorrente de uma reação inflamatória aguda, foi determinado pela diferença entre o volume final (V_F) e volume inicial (V_I) das patas.

$$V_E = V_F - V_I$$

3.3.1.2 Edema de pata induzido por dextrano em ratos

O modelo de edema de pata induzido por dextrano foi realizado segundo o método descrito por PARRAT e WEST (1972). Foram utilizados ratos Wistar (150 - 200 g), escolhidos ao acaso e divididos em grupos de 6 a 18 animais cada. As patas direitas traseiras foram marcadas a nível da borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar e seus volumes (ml) foram medidos por meio de pletismógrafo (V_I).

Os animais foram tratados por via oral (v.o.) com a FH (10 e 20 mg/kg) e ciproheptadina (10 mg/kg), num volume de 10 ml/kg de peso. O grupo controle recebeu água destilada, em volume correspondente aos demais grupos. Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar de 0,1 ml de uma solução de dextrano 1,5% p/v. O volume das patas foi medido antes da injeção do agente inflamatório (V_I) e nos períodos de 1/2, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção (V_F). O volume do edema (V_E) foi determinado pela fórmula referida anteriormente.

3.3.1.3 Migração de neutrófilos induzida por carragenina ou N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) na cavidade peritoneal de ratos

Ratos Wistar (170 - 220 g), escolhidos aleatoriamente, foram divididos em 5 grupos de 6 animais cada. O grupo I foi tratado com salina 0,9 % por via oral (v.o.) (controle), o grupo II não recebeu tratamento, os grupos III e IV receberam FH (10 e 20 mg/kg, v.o. respectivamente) e o grupo V recebeu dexametasona (0,5 mg/kg), por via subcutânea (s.c.). Os tratamentos dos grupos I, III e IV foram feitos 60 min, e do grupo V, 30 min antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de 1 ml de carragenina (300 μ g/animal) ou FMLP (10^{-4} M/animal). O grupo II recebeu uma injeção de salina por via i.p. Quatro horas após a injeção do agente flogístico foi avaliada a migração de neutrófilos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e logo em

seguida suas cavidades peritoneais foram lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) heparinizada a 0,1% contendo albumina sérica bovina (3%) a 1%. Após leve massagem no abdômen, foram coletados 6 ml do exsudato. As contagens total e diferencial das células foram executadas baseadas no método de SOUZA e FERREIRA (1985). Para a contagem total dos leucócitos, foram retirados 20 µl de exsudato e acrescentados 380 µl de corante de Turk. Para a contagem diferencial, o exsudato foi centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspendido em 200 µl de albumina bovina a 3% e distribuído em lâminas. Após serem coradas com o corante panótico rápido, foi feita a contagem diferencial das células. Os resultados foram expressos em número de células por mililitro (ml).

3.3.1.4 Permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e serotonina em ratos

O modelo de permeabilidade vascular cutânea foi realizado segundo MASSO et al. (1994), ligeiramente modificado. Foram utilizados ratos Wistar (120 - 200 g), escolhidos ao acaso e divididos em grupos de 5 a 12 animais. Na véspera do experimento, os animais tiveram seus dorsos depilados sobre leve anestesia com éter etílico.

Os animais foram tratados, por via oral (v.o.), com FH (1, 2 e 10 mg/kg), e por via subcutânea (s.c.) com talidomida (1 mg/kg), 1 hora e 15 minutos respectivamente antes da injeção dos agentes inflamatórios. Um outro grupo recebeu conjuntamente FH (1 mg/kg, v.o.) e talidomida (1 mg/kg, s.c.). O controle recebeu salina em volume correspondente.

Decorrido o tempo de tratamento, os animais receberam uma injeção intradérmica de histamina (0,2 mg/animal), 5-hidroxitriptamina (serotonina) (1,0 mg/animal) e salina, em três regiões diferentes da área depilada (o volume foi constante e igual a 0,1 ml/região). Uma hora após as injeções intradérmicas, os animais receberam uma injeção intravenosa de solução de azul de Evans (50 mg/kg). Após 30 min da injeção de azul de Evans, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a pele da região dorsal, nos sítios das injeções de histamina, serotonina e salina, foi dissecada e separadas as regiões de manchas azuladas. Fragmentos de pele, correspondendo aos locais das injeções, foram incubados por 24 h a 36° C em 2 ml de formamida pura. Decorrido este período, os fragmentos foram removidos e a leitura dos líquidos foi efetuada em espectrofotômetro a 560 nm.

3.3.2 Atividade antiangiogênica

A medida da atividade antiangiogênica da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão foi realizada segundo o método de KIMURA et al. (1985), ligeiramente modificado.

Ratos Wistar (150 - 180 g), escolhidos aleatoriamente, foram divididos em grupos de 6 animais cada. Vinte mililitros (ml) de ar foram injetados subcutaneamente no dorso dos animais para produzir uma bolsa de ar oval e regular. Após 3 dias, mais 10 ml de ar foram injetados para manter a regularidade das bolsas. No dia seguinte, foram aplicados 0,5 ml de adjuvante completo de Freund (ACF) contendo 0,1% de óleo de cróton nas bolsas de ar. Após a injeção do ACF, os animais foram tratados por via oral (v.o.) com FH (10 e 20 mg/kg) ou água destilada (grupo controle), num volume de 10 ml/kg de peso, durante 5 dias. Decorrido este período, os animais foram mortos pela injeção intravenosa de 1 ml de solução de carmina a 10%, contendo 5% de gelatina e aquecida a 40° C. As peles foram dissecadas no local das bolsas de ar e solubilizadas em hidróxido de sódio 3N (5 ml).

Após 24 horas, a solução foi acidificada com ácido clorídrico 36%, centrifugada a 3000 rpm por 20 min e filtrada. O conteúdo de carmina no filtrado foi determinado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 490 nm. A concentração de carmina é proporcional à formação de novos vasos nas bolsas de ar.

3.3.3 Atividade antinociceptiva

3.3.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

O modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%, foi utilizado segundo o método originalmente descrito por VANDER e MARGOLIN (1956) para ratos, e modificado por KOSTER et al., (1959) para camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss, machos (20 - 30 g), reunidos em grupos de 5 a 15 animais. A solução de ácido acético a 0,6% (v/v) foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) num volume de 10 ml/kg de peso. A seguir foi registrado o número de contorções abdominais apresentadas pelos animais durante 20 min, sendo iniciada a contagem 10 min após a injeção do ácido. Uma hora ou 15 min antes da avaliação, os animais foram tratados por via oral (v.o.), com água destilada (grupo controle), fração hidrossolúvel (FH) (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg) ou por via subcutânea (s.c.), com talidomida (0,5 e 1,0 mg/kg), respectivamente.

Alguns grupos foram tratados conjuntamente com FH e talidomida, para avaliar uma possível potencialização dos seus efeitos. Experimentos similares foram feitos utilizando-se a FH (0,5 e 1,0 mg/kg), administrada intraperitonealmente, 30 min antes da injeção de ácido acético.

3.3.3.2 Teste da Formalina

No teste da formalina, segundo o método descrito por HUNSKAAR et al., (1985), o tempo gasto em segundos pelo animal lambendo a pata, é registrado durante os períodos de 0 - 5 min (fase inicial) e 20 - 25 min (fase tardia) após a injeção intraplantar de formalina (20 µl de uma solução a 1%, v/v), na pata traseira direita do animal. Em camundongos, esse teste deve ser realizado à temperatura ambiente de 22 - 23° C ou 26 -28° C e na ausência de fatores estressantes, incluindo sons, odores e alta luminosidade, como medida para evitar modificações na resposta comportamental (TJOLSEN et al., 1992).

Foram utilizados camundongos Swiss (20 - 30 g), machos, escolhidos ao acaso. A FH (1 mg/kg) ou as frações semi-purificadas (FS) I (0,25 e 0,5 mg/kg) e II (0,25 e 0,5 mg/kg), obtidas a partir da cromatografia da FH em Sephadex G-100, foram administradas por via oral (v.o.) num volume de 10 ml/kg de peso, 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina. Ao grupo controle, foi administrado um volume equivalente de água destilada. Experimento similar foi feito com a FH (0,5 mg/kg) por via oral e por via intraplantar, 1 hora e 30 min antes da injeção de formalina, respectivamente.

O efeito da naloxona, um conhecido antagonista opióide, sobre o efeito antinociceptivo da FH, foi determinado pela administração subcutânea (s.c.) da naloxona (2 mg/kg), 15 min antes do tratamento com a FH (1 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.), sendo que esta última foi administrada 30 min antes da injeção de formalina.

Para avaliar o possível envolvimento do óxido nítrico na antinocicepção induzida pela FH, a L-arginina, um substrato para síntese de óxido nítrico, (400 e 800 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal (i.p.), 5 min antes da FH (1 mg/kg, v.o.), administrada 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina. No estudo do efeito do N^ω-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), um inibidor da óxido nítrico

sintase, sobre a nocicepção induzida pela formalina, os animais foram tratados por via intraperitoneal com L-NAME (18,7 e 37,5 mg/kg de peso) 15 min antes da injeção de formalina. Os demais grupos receberam L-arginina (400 e 800 mg/kg, i.p.) e L-NAME (37,5 mg/kg, i.p.), 20 e 15 minutos respectivamente, antes da injeção intraplantar de formalina.

Experimentos similares foram feitos para avaliar uma possível potencialização do efeito antinociceptivo da FH (0,5 e 1,0 mg/kg, v.o.) e das frações semi-purificadas (FS) I (0,5 mg/kg, v.o.) e II (0,25 mg/kg, v.o.) pelo L-NAME (10 mg/kg, i.p.).

3.3.3.3 Teste da placa quente

Para avaliar um possível efeito analgésico central da fração hidrossolúvel (FH), o teste da placa quente foi utilizado, segundo o método de EDDY e LEIMBACH (1953). Os camundongos que exibiram respostas características ao estímulo térmico ($55 \pm 0,5^\circ$ C) na placa quente (lamber as patas posteriores e/ou saltar sobre a placa) em cerca de 20 segundos, foram selecionados para o teste. Camundongos Swiss (20 - 25 g), foram divididos em grupos de 10 animais cada e tratados com FH (1 e 10 mg/kg) e salina 0,9% (grupo controle) por via oral (v.o.), e morfina (10 mg/kg) por via subcutânea (s.c.).

A avaliação foi realizada antes (0 min) e após (30, 60 e 90 min) a administração da substâncias e registrado o tempo decorrido até que o animal demonstrasse resposta ao estímulo térmico. Um tempo de 45 segundos foi considerado como tempo máximo de reação para prevenir danos às patas dos animais.

3.4 ESTATÍSTICOS

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos experimentos de toxicidade subaguda e crônica, foram expressos como média \pm desvio padrão da média (D.P.M.) e comparados através do cálculo do intervalo de confiança (IC = D.P.M. \times 1,96) obtido do grupo controle. Foram considerados significativos os valores que ficaram fora deste intervalo. Os demais resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e comparados pela análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa Statview de um computador modelo Macintosh. As significâncias dos contrastes entre as médias foram estudadas pelo teste de Fisher e estabelecidos níveis de significância em $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

4 - RESULTADOS

4.1 BIOQUÍMICOS

4.1.1 Cromatografia em coluna de gel de Sephadex G-100

A fração hidrossolúvel (FH) (300 mg em 1,5 ml), obtida da cartilagem de tubarão, foi cromatografada em coluna de gel de Sephadex G-100 e, as frações obtidas (FS I e FS II) foram lidas em 280 nm. O perfil cromatográfico da FH encontra-se apresentado na Figura 2. O volume de eluição (V_E), correspondente a maior absorção de luz em 280 nm, das frações obtidas (FS I e FS II) foi de 49 e 142 ml respectivamente. O volume de exclusão (V_O) da coluna utilizada foi de 47 ml. O valor de V_E/V_O da FS I e FS II foi de 1,0426 e 3,0213 respectivamente. Plotando-se esses pontos no gráfico de regressão linear, obtido a partir da relação do logaritmo do peso molecular das proteínas padrões usadas para calibrar a coluna (Albumina - 4,819, Anidrase carbônica - 4,462, Citocromo C - 4,093) versus V_E/V_O das mesmas proteínas para essa coluna (Albumina - 1,2128, Anidrase carbônica - 1,7447, Citocromo C - 2,0426), foram obtidos os logaritmos dos pesos moleculares da FS I (5,0049) e FS II (3,2709), equivalentes aos pesos moleculares de 101 e 1,9 KDa respectivamente (Figura 3).

4.1.2 Determinação do conteúdo proteico

A concentração total de proteínas existentes na fração hidrossolúvel (FH), assim como nas frações semi-purificadas (FS) I e II obtidas a partir da cromatografia

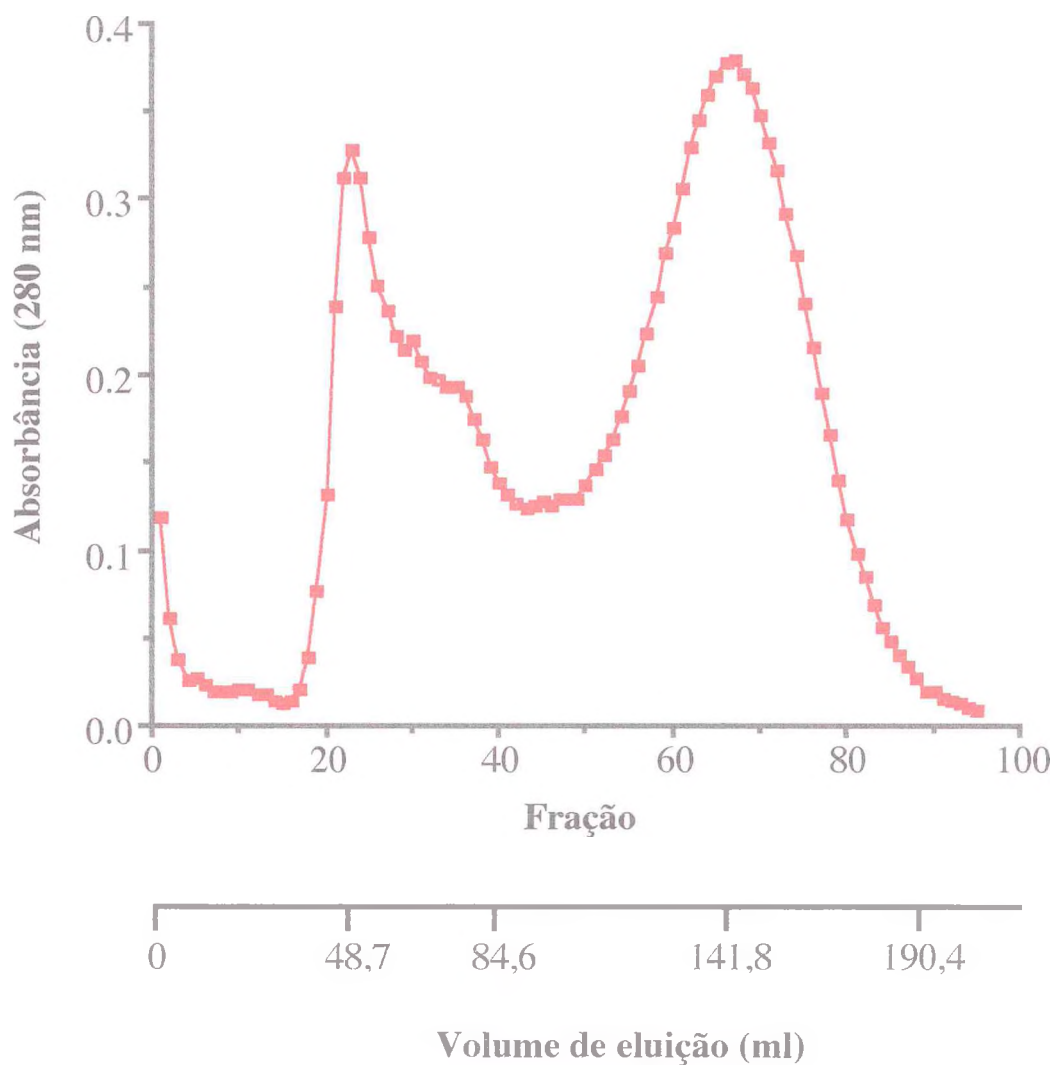


Figura 2 - Perfil cromatográfico da fração hidrossolúvel (FH) em gel de Sephadex G-100. A cromatografia da FH (300 mg/1,5 ml) foi realizada em coluna de gel de Sephadex G-100, como descrito em "Métodos". A ordenada representa a absorbância das frações (2 ml) coletadas e medidas em comprimento de onda de 280 nm. A abcissa representa o número de cada fração. O volume de eluição das frações está representado abaixo das abcissas.

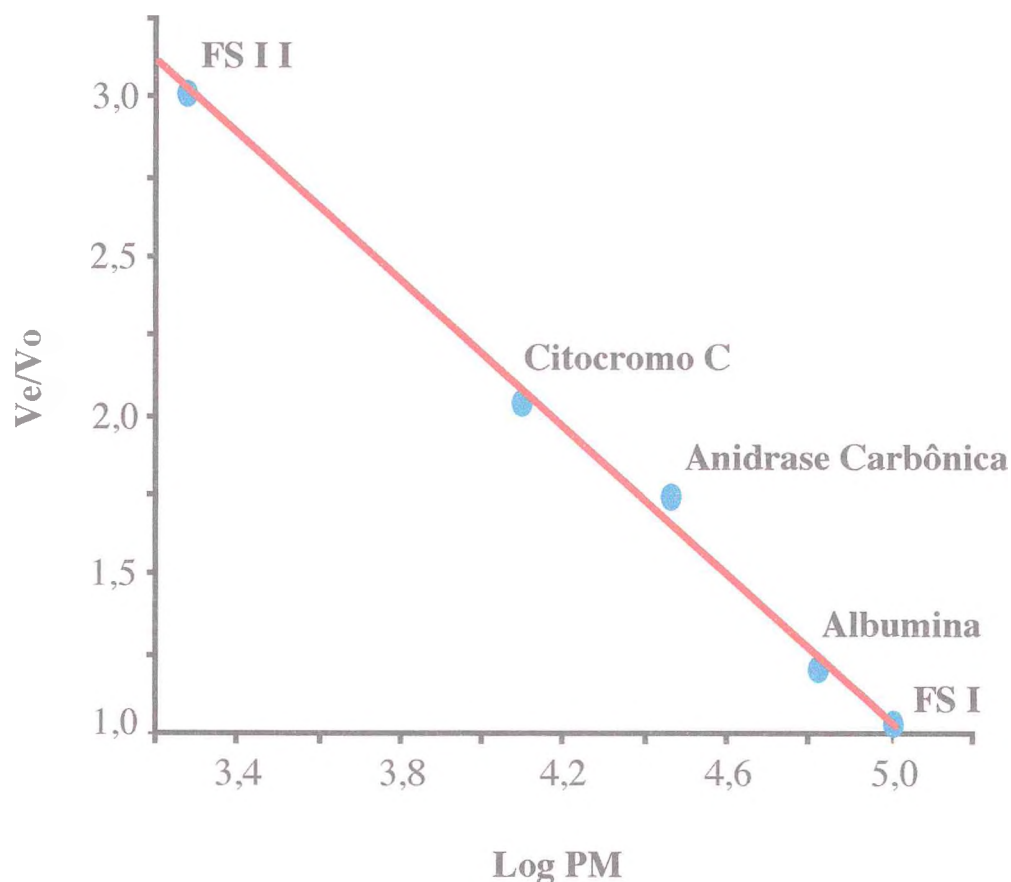


Figura 3 - Peso molecular aproximado (PM) das frações semi-purificadas (FS I e FS II) obtidas a partir da cromatografia da fração hidrossolúvel (FH) em gel de Sephadex G-100. A FH foi aplicada na concentração de 300 mg/1,5 ml. A regressão linear foi obtida através da relação entre o logaritmo do PM das proteínas usadas para calibrar a coluna versus o volume de eluição das proteínas/volume de exclusão (Ve/Vo).

da FH foi de 138; 88,1 e 44,4 mg/ml correspondendo a 46; 49 e 40% de proteínas no material bruto.

4.2 TOXICOLÓGICOS

4.2.1 Efeitos comportamentais e toxicidade aguda da cartilagem de tubarão

Após a administração oral (v.o.) de 1 g/kg da cartilagem de tubarão, não foram observadas alterações no comportamento dos animais. Entretanto, com a dose de 2 g/kg, v.o., um dos animais apresentou movimentos esteriotipados que perduraram até cerca de 120 min, após o tratamento. Não foram observadas mortes com nenhuma das doses ao final de 72 horas de observação. O grupo controle não apresentou alteração comportamental.

Com relação a administração intraperitoneal (i.p.) da cartilagem de tubarão, a dose de 1 g/kg provocou piloereção e diminuição da atividade motora espontânea em todos os animais, 30 min após sua administração. Não foram observadas mortes nesse grupo ao final de 72 horas. Com a dose de 2 g/kg, i.p., os principais efeitos observados foram piloereção, ptose e sonolência. Um dos animais apresentou movimentos esteriotipados que perduraram até cerca de 120 min. Após um período de 72 horas não foram observadas mortes. O grupo controle, administrado com salina a 0,9%, não demonstrou qualquer alteração comportamental.

4.2.2 Toxicidade subaguda da cartilagem de tubarão

O tratamento de ratas Wistar com cartilagem de tubarão (1 g/kg/dia), durante 30 dias, por via oral, não afetou o consumo de alimentos e água, nem o comportamento dos animais. Durante esse período não foram registradas mortes. O acompanhamento semanal do peso corporal dos grupos controle e tratado encontram-se representados na Tabela 1. Houve um aumento progressivo no peso dos animais em ambos os grupos.

Os parâmetros hematológicos e a bioquímica do sangue, obtidos no início e final do tratamento, estão contidos nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Nenhuma alteração significativa foi observada nos parâmetros bioquímicos do grupo tratado no final do tratamento. Com relação aos parâmetros hematológicos, o grupo controle, ao final do tratamento, apresentou um pequeno aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ($37,4 \pm 0,69$ g/dl) em relação ao intervalo de confiança do controle antes do tratamento (33,7 — 36,9 g/dl).

4.2.3 Toxicidade crônica da cartilagem de tubarão

Nas Tabelas 4 e 5 estão representadas as médias de peso corporal dos animais (ratos Wistar machos e fêmeas) controles e tratados com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg, por via oral (v.o.), durante 90 dias. Houve um aumento progressivo semanal do peso corporal em todos os grupos. O tratamento não afetou o comportamento dos animais nem o consumo de alimentos e água. Durante esse período também não foram registradas mortes. O mesmo foi observado nas ratas tratadas com cartilagem de tubarão (CT) na dose de 500 mg/kg, v.o., durante 90 dias.

Tabela 1 - Peso corporal de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 1 g/kg/dia, durante 30 dias

Grupo	Dose/ Via de administração (n)	Semana				
		0	1	2	3	4
Controle	- (9)	209 ± 5,1	214,7 ± 5,4	222,2 ± 5,4	223,8 ± 5,6	226,3 ± 5,8
CT	1 g/kg, v.o. (10)	189,9 ± 1,6	195,0 ± 2,2	202,2 ± 2,7	206,6 ± 3,0	208,8 ± 3,0

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT), 1 g/kg/dia, v.o., durante 30 dias. O acompanhamento do peso corporal foi feito semanalmente. Os valores representam média ± E.P.M. do peso corporal dos animais (ANOVA e Fisher).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 1 g/kg/dia, durante 30 dias

PARÂMETRO	GRUPO		
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (CT 1 g/kg)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7,1 \pm 0,30 (6,6 — 7,7)	7,1 \pm 0,46	7,3 \pm 0,39
Hemoglobina (g/dl)	14,1 \pm 0,52 (13,1 — 15,1)	14,1 \pm 0,62	14,9 \pm 0,56
Hematócrito (%)	40,0 \pm 1,91 (36,3 — 43,8)	37,7 \pm 1,83	42,0 \pm 1,73
VCM (fl)	56,1 \pm 1,77 (52,6 — 59,5)	53,1 \pm 1,13	57,5 \pm 1,74
HCM (pg)	19,8 \pm 0,54 (18,7 — 20,9)	19,9 \pm 0,63	20,4 \pm 0,65
CHCM (g/dl)	35,3 \pm 0,82 (33,7 — 36,9)	37,4 \pm 0,69*	35,4 \pm 0,47
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	635,5 \pm 71,81 (494,7 — 776,2)	755,8 \pm 77,35	655,0 \pm 87,73
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7,4 \pm 1,64 (4,2 — 10,6)	8,0 \pm 2,40	7,1 \pm 1,60
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,95 \pm 0,24 (0,48 — 1,42)	1,0 \pm 0,18	0,91 \pm 0,15
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5,3 \pm 1,51 (2,3 — 8,2)	6,4 \pm 2,21	5,2 \pm 1,39
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,59 \pm 0,24 (0,12 — 1,06)	0,54 \pm 0,19	0,82 \pm 0,37
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,036 \pm 0,004 (0,004 — 0,068)	0,04 \pm 0,015	0,051 \pm 0,005
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,014 \pm 0,001 (0,002 — 0,026)	0,016 \pm 0,007	0,012 \pm 0,006

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 1 g/kg, v.o., durante 30 dias. Os parâmetros hematológicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média \pm D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle \times 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 3- Parâmetros bioquímicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 1 g/kg/dia, durante 30 dias

PARÂMETROS	GRUPO		
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (CT 1 g/kg)
Glicose (mg/dl)	81,2 ± 25,18 (31,9 — 130,6)	58,6 ± 9,23	69,8 ± 26,22
ALT (U/ml)	24,8 ± 4,09 (16,8 — 32,8)	10,4 ± 3,13*	23,3 ± 5,74
AST (U/ml)	73,9 ± 12,99 (48,5 — 99,4)	51,6 ± 4,45	64,4 ± 16,32
Fosfatase alcalina (U/l)	21,2 ± 6,84 (7,8 — 34,6)	13,3 ± 2,54	20,8 ± 4,54
Creatinina (mg/dl)	0,98 ± 0,17 (0,64 — 1,32)	1,13 ± 0,09	0,79 ± 0,22
Uréia (mg/dl)	45,6 ± 10,34 (25,3 — 65,9)	50,6 ± 10,12	58,2 ± 6,93
Colesterol (mg/dl)	69,7 ± 15,75 (38,8 — 100,5)	38,2 ± 14,35*	52,4 ± 13,49
Triglicérides (mg/dl)	34,9 ± 12,4 (10,7 — 59,2)	25,5 ± 8,73	36,5 ± 16,40
Lipídeos (mg/dl)	363,9 ± 126,5 (116,0 — 611,8)	175,7 ± 31,68	459,6 ± 98,24

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 1 g/kg, v.o., durante 30 dias. Os parâmetros bioquímicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média ± D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 4 - Peso corporal de ratos Wistar tratados por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia, durante 90 dias

GRUPO/ DOSE	SEMANA													
	(n)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Controle (n=8)	186,4 ± 7,58	200,3 ± 7,75	213,3 ± 7,36	230,8 ± 8,44	241,3 ± 8,78	251,2 ± 8,87	258,6 ± 8,85	267,3 ± 8,82	272,8 ± 8,77	273,4 ± 7,26	277,8 ± 8,86	282,2 ± 7,31	283,8 ± 7,29	286,8 ± 8,37
CT 100 mg/kg (n=10)	173,1 ± 5,10	183,8 ± 6,77	193,5 ± 6,32	210,6 ± 5,93	226,0 ± 5,21	235,8 ± 4,95	244,1 ± 5,39	252,5 ± 6,12	257,9 ± 6,14	262,6 ± 7,05	267,3 ± 7,62	274,8 ± 6,94	276,1 ± 6,53	279,1 ± 6,51
CT 200 mg/kg (n=9)	187,6 ± 4,73	200,7 ± 5,39	209,5 ± 5,45	229,5 ± 5,96	240,8 ± 6,84	248,0 ± 7,32	254,7 ± 7,69	258,8 ± 7,91	261,6 ± 8,10	262,2 ± 7,33	266,0 ± 8,96	267,0 ± 8,41	270,8 ± 8,25	272,2 ± 8,60

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 100 e 200 mg/kg/dia, v.o., durante 90 dias. Os valores representam média ± E.P.M. do peso corporal dos animais controles e tratados. O número de animais em cada grupo é dado em parênteses (ANOVA e Fisher).

Tabela 5 - Peso corporal de ratas Wistar tratadas por via oral durante 90 dias com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg/dia

GRUPO/ DOSE (n)	SEMANA													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Controle (n=8)	122,6 ± 2,38	144,1 ± 1,92	154,9 ± 6,15	169,1 ± 2,16	173,4 ± 2,70	183,5 ± 2,97	192,9 ± 3,23	194,3 ± 3,52	197,6 ± 3,90	198,4 ± 3,91	202,5 ± 4,60	203,8 ± 4,50	204,6 ± 3,63	206,6 ± 4,22
CT 100 mg/kg (n=10)	117,3 ± 2,98	140,5 ± 3,17	149,9 ± 3,43	168,6 ± 3,07	176,5 ± 3,31	183,8 ± 4,03	193,8 ± 3,70	198,4 ± 3,53	199,8 ± 4,00	201,0 ± 3,89	204,2 ± 4,31	205,5 ± 4,06	207,6 ± 3,85	208,5 ± 4,10
CT 200 mg/kg (n=9)	110,3 ± 3,36	136,9 ± 3,56	148,2 ± 3,22	162,1 ± 3,53	170,8 ± 3,77	180,2 ± 3,97	186,1 ± 4,33	187,4 ± 3,93	192,3 ± 4,09	193,4 ± 4,44	197,8 ± 4,05	201,1 ± 3,76	202,4 ± 4,15	204,7 ± 3,92

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 100 e 200 mg/kg/dia, v.o., durante 90 dias. Os valores representam média ± E.P.M. do peso corporal dos animais controles e tratados. O número de animais por grupo é dado em parênteses. (ANOVA e Fisher).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos das ratas tratadas com CT 100 e 200 mg/kg, v.o., durante 90 dias, obtidos no início e final do tratamento, estão representados nas Tabelas 6 e 7 respectivamente. Os valores hematológicos dos grupos controles e tratados não apresentaram diferenças significativas entre si. Entretanto, com relação aos parâmetros bioquímicos, os níveis de uréia nos grupos tratados mostraram-se mais elevados (CT 100 mg/kg, v.o.: $73,6 \pm 17,29$ mg/dl e CT 200 mg/kg, v.o.: $94,0 \pm 20,30$ mg/dl) em relação ao intervalo de confiança (IC) obtido a partir dos valores controles antes do tratamento (21,0 — 65,9 mg/dl). A fosfatase alcalina dos grupos tratados (CT 100 mg/kg, v.o.: $18,7 \pm 5,31$ U/l e CT 200 mg/kg, v.o.: $21,6 \pm 4,43$ U/l) também apresentou valores fora do IC do grupo controle antes do tratamento (49,2 — 119,7 U/l). Contudo, os níveis de fosfatase alcalina do grupo controle no final do tratamento ($17,6 \pm 5,28$ U/l) também apresentaram-se fora do IC do grupo controle antes do tratamento.

Nas Tabelas 8 e 9 estão representados os parâmetros hematológicos e bioquímicos das ratas tratadas com CT 500 mg/kg, v.o., durante 90 dias, no início e final do tratamento. Os níveis de uréia do grupo tratado ($88,5 \pm 8,04$ mg/dl), assim como do grupo controle no final do tratamento ($77,0 \pm 16,02$ mg/dl) apresentaram-se mais elevados em relação ao intervalo de confiança (IC) do controle antes do tratamento (33,1 — 68,9 mg/dl). Com relação aos parâmetros hematológicos, o número de hemácias, assim como a hemoglobina e o hematócrito, tanto do grupo controle no final do tratamento como do grupo tratado mostraram-se fora do IC do controle no início do tratamento. Entretanto, esses valores mantiveram-se dentro dos padrões normais registrados na literatura.

Os parâmetros hematológicos (Tabela 10) dos animais machos tratados com CT 100 e 200 mg/kg, v.o., durante 90 dias, apresentaram diferenças no número de hemácias (He) e na concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos grupos controle final (He: $8,0 \pm 0,35 \times 10^6/\mu\text{l}$ e CHCM: $32,8 \pm 0,73$ g/dl) e tratado

Tabela 6- Parâmetros hematológicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg, durante 90 dias

PARÂMETROS	GRUPO			
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (100 mg/kg)	TRATADO (200 mg/kg)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6,5 \pm 0,27 (6,0 — 7,1)	6,9 \pm 0,30	6,4 \pm 0,37	6,8 \pm 0,39
Hemoglobina (g/dl)	13,3 \pm 0,52 (12,3 — 14,3)	13,9 \pm 0,41	13,2 \pm 0,96	13,6 \pm 0,64
Hematócrito (%)	36,9 \pm 1,78 (33,4 — 40,4)	38,0 \pm 1,47	36,2 \pm 2,42	36,7 \pm 2,10
VCM (fl)	56,5 \pm 2,11 (52,4 — 60,6)	54,6 \pm 1,25	56,8 \pm 1,07	54,0 \pm 1,30
HCM (pg)	20,4 \pm 0,63 (19,7 — 21,0)	20,0 \pm 0,78	20,7 \pm 0,54	20,0 \pm 0,73
CHCM (g/dl)	36,0 \pm 1,55 (33,0 — 39,0)	36,6 \pm 0,84	36,4 \pm 0,93	37,0 \pm 0,76
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	739,5 \pm 98,65 (546,1 — 932,9)	656,7 \pm 55,05	584,4 \pm 59,97	646,7 \pm 75,60
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6,5 \pm 1,98 (2,7 — 10,4)	5,1 \pm 1,55	8,0 \pm 2,08	6,2 \pm 1,64
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,4 \pm 0,45 (0,5 — 2,2)	0,7 \pm 0,19	1,2 \pm 0,36	0,9 \pm 0,34
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4,8 \pm 1,54 (1,7 — 7,8)	4,1 \pm 1,44	6,1 \pm 1,88	4,9 \pm 1,66
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,45 \pm 0,22 (0,02 — 0,88)	0,28 \pm 0,10	0,64 \pm 0,26	0,33 \pm 0,06
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,03 \pm 0,012 (0,009 — 0,057)	0,03 \pm 0,008	0,05 \pm 0,024	0,03 \pm 0,011
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,019 \pm 0,008 (0,002 — 0,035)	0,011 \pm 0,004	0,013 \pm 0,007	0,008 \pm 0,004

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 100 e 200 mg/kg, v.o., durante 90 dias. Os parâmetros hematológicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média \pm D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 7- Parâmetros bioquímicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg, durante 90 dias

PARÂMETROS	GRUPO			
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (100 mg/kg)	TRATADO (200 mg/kg)
Glicose (mg/dl)	53,0 ± 15,46 (22,7 — 83,3)	53,9 ± 12,53	52,7 ± 12,15	79,5 ± 19,85
AST (U/ml)	43,3 ± 4,18 (35,1 — 51,5)	37,0 ± 6,50	44,8 ± 5,98	45,1 ± 11,62
Fosfatase alcalina (U/l)	84,4 ± 17,98 (49,2 — 119,7)	17,6 ± 5,28*	18,7 ± 5,31*	21,6 ± 4,43*
Creatinina (mg/dl)	1,2 ± 0,49 (0,23 — 2,2)	1,3 ± 0,64	2,1 ± 0,25	1,5 ± 0,53
Uréia (mg/dl)	43,4 ± 11,46 (21,0 — 65,9)	61,1 ± 10,54	73,6 ± 17,29*	94,0 ± 20,30*
Colesterol (mg/dl)	47,0 ± 15,52 (16,6 — 77,4)	52,3 ± 18,73	69,3 ± 11,55	61,3 ± 12,34
Triglicérides (mg/dl)	33,1 ± 12,68 (8,2 — 57,9)	33,4 ± 12,66	33,3 ± 28,97	46,7 ± 18,49
Lipídeos (mg/dl)	317,5 ± 92,98 (135,3 — 499,8)	464,2 ± 115,97	490,1 ± 206,4	402,2 ± 174,5

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 100 e 200 mg/kg, v.o., durante 90 dias. Os parâmetros bioquímicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média ± D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 8 - Parâmetros hematológicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 500 mg/kg/dia, durante 90 dias

PARÂMETROS	GRUPO		
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (500 mg/kg)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6,5 \pm 0,26 (6,0 — 7,0)	7,7 \pm 0,48*	7,6 \pm 0,34*
Hemoglobina (g/dl)	12,8 \pm 0,55 (11,7 — 13,9)	14,9 \pm 0,25*	14,5 \pm 0,54*
Hematócrito (%)	35,8 \pm 1,54 (32,7 — 38,8)	43,2 \pm 1,60*	41,0 \pm 1,81*
VCM (fl)	55,0 \pm 1,81 (51,5 — 58,6)	56,1 \pm 2,46	54,1 \pm 1,73
HCM (pg)	19,7 \pm 0,59 (18,5 — 20,8)	19,4 \pm 0,90	19,1 \pm 0,66
CHCM (g/dl)	35,8 \pm 0,59 (34,6 — 37,0)	34,5 \pm 0,76*	35,2 \pm 0,66
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	708,2 \pm 117,98 (476,9 — 939,4)	540,4 \pm 54,89	581,1 \pm 94,89
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	8,9 \pm 1,73 (5,5 — 12,3)	7,5 \pm 1,28	7,5 \pm 1,82
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,61 \pm 0,14 (0,33 — 0,89)	0,60 \pm 0,09	0,65 \pm 0,31
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7,1 \pm 1,59 (4,0 — 10,3)	5,1 \pm 1,98	5,1 \pm 1,61
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,00 \pm 0,35 (0,34 — 1,72)	1,15 \pm 0,41	1,56 \pm 0,53
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,03 \pm 0,014 (0,003 — 0,057)	0,03 \pm 0,013	0,06 \pm 0,030
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,022 \pm 0,008 (0,006 — 0,038)	0,013 \pm 0,005	0,017 \pm 0,008

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 500 mg/kg, v.o., durante 90 dias. Os parâmetros hematológicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média \pm D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle \times 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 9 - Parâmetros bioquímicos de ratas Wistar tratadas por via oral com cartilagem de tubarão 500 mg/kg/dia, durante 90 dias

PARÂMETROS	GRUPO		
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (500 mg/kg)
Glicose (mg/dl)	49,3 ± 17,98 (14,1 — 84,6)	50,5 ± 9,94	65,7 ± 16,87
ALT (U/ml)	14,2 ± 3,46 (7,4 — 20,9)	17,4 ± 7,54	16,7 ± 13,67
AST (U/ml)	90,7 ± 15,85 (59,6 — 121,7)	111,6 ± 11,87	115,0 ± 18,06
Fosfatase alcalina (U/l)	103,9 ± 35,00 (35,3 — 172,5)	41,9 ± 10,02	48,8 ± 5,12
Creatinina (mg/dl)	0,80 ± 0,09 (0,62 — 0,98)	0,92 ± 0,07	0,89 ± 0,13
Uréia (mg/dl)	51,0 ± 9,13 (33,1 — 68,9)	77,0 ± 16,02*	88,5 ± 8,04*
Colesterol (mg/dl)	50,0 ± 17,38 (16,0 — 84,1)	50,3 ± 11,28	56,0 ± 8,06
Triglicérides (mg/dl)	34,2 ± 13,93 (7,0 — 61,5)	39,4 ± 15,27	42,4 ± 16,40
Lipídeos (mg/dl)	191,2 ± 69,18 (55,6 — 326,8)	166,8 ± 52,09	183,6 ± 43,96
Albumina (g/dl)	3,6 ± 0,32 (3,0 — 4,3)	4,3 ± 0,79	3,7 ± 0,78

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 500 mg/kg, v.o., durante 90 dias. Os parâmetros bioquímicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média ± D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

com CT 100 mg/kg, v.o. (He: $8,2 \pm 0,34 \times 10^6/\mu\text{l}$ e CHCM: $33,5 \pm 0,50$ g/dl), em relação ao intervalo de confiança (IC) obtido do controle inicial (He: 6,0 — $7,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ e CHCM: 33,7 — 37,2 g/dl). O hematócrito do grupo controle final mostrou um leve aumento ($45,6 \pm 1,75\%$), em relação ao IC do controle inicial (34,3 — 45,1%).

Em relação aos ratos tratados com CT 100 e 200 mg/kg, v.o., durante 90 dias, os parâmetros bioquímicos (Tabela 11) revelaram uma diminuição nos níveis de fosfatase alcalina no grupo controle final ($46,7 \pm 12,73$ U/l) e nos grupos tratados (CT 100 mg/kg, v.o.: $48,9 \pm 10,04$ U/l e CT 200 mg/kg, v.o.: $33,0 \pm 8,61$ U/l), quando comparados ao IC do grupo controle antes do tratamento. Os níveis da aspartato-aminotransferase (AST) do grupo controle no final do tratamento, apresentaram-se levemente aumentados em relação ao IC do grupo controle antes do tratamento. Contudo, os níveis de AST apresentaram-se dentro dos padrões normais descritos na literatura.

4.2.4 Efeitos da cartilagem de tubarão sobre a função reprodutora

A cartilagem de tubarão (CT 500 mg/kg), administrada oralmente (v.o.), durante 150 dias (antes e durante o acasalamento e gestação) a ratas Wistar, não causou nenhuma alteração no que se refere à concepção e/ou gestação. Do mesmo modo, nenhuma variação significativa foi encontrada no número de filhotes dos grupos controle e tratado (Tabela 12). Não houve variação significativa no peso corporal dos filhotes do grupo tratado ($5,4 \pm 0,08$ g) em relação aos filhotes do grupo controle ($5,5 \pm 0,06$ g). O exame dos filhotes, antes do desmame não revelou nenhuma alteração visível. Entretanto, após o desmame foram observadas malformações como opacidade da córnea e diminuição no tamanho da fenda ocular

Tabela 10 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg, durante 90 dias

PARÂMETROS	GRUPO			
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (100 mg/kg)	TRATADO (200 mg/kg)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6,9 \pm 0,48 (6,0 — 7,9)	8,0 \pm 0,35*	8,2 \pm 0,34*	7,6 \pm 0,36
Hemoglobina (g/dl)	14,1 \pm 0,82 (12,5 — 15,7)	15,0 \pm 0,40	15,0 \pm 0,57	14,6 \pm 0,59
Hematócrito (%)	39,7 \pm 2,76 (34,3 — 45,1)	45,6 \pm 1,75*	44,8 \pm 1,38	43,0 \pm 1,71
VCM (fl)	57,3 \pm 1,46 (54,4 — 60,1)	57,0 \pm 1,39	54,7 \pm 1,60	56,9 \pm 1,33
HCM (pg)	20,3 \pm 0,60 (19,1 — 21,5)	18,7 \pm 0,67	18,4 \pm 0,74	19,4 \pm 0,52
CHCM (g/dl)	35,4 \pm 0,88 (33,7 — 37,2)	32,8 \pm 0,73*	33,5 \pm 0,50*	34,1 \pm 0,59
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	542,3 \pm 120,94 (305,3 — 779,3)	445,3 \pm 31,63	521,8 \pm 44,35	401,5 \pm 60,77
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	9,4 \pm 2,15 (5,2 — 13,6)	7,6 \pm 1,65	8,9 \pm 2,44	6,7 \pm 1,31
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,92 \pm 0,41 (0,12 — 1,72)	1,09 \pm 0,34	1,12 \pm 0,31	1,21 \pm 0,40
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7,2 \pm 1,65 (3,9 — 10,4)	5,5 \pm 1,26	6,1 \pm 1,64	4,7 \pm 0,79
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,67 \pm 0,26 (0,17 — 1,18)	0,93 \pm 0,39	0,92 \pm 0,30	0,60 \pm 0,12
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,03 \pm 0,012 (0,008 — 0,060)	0,03 \pm 0,011	0,04 \pm 0,020	0,03 \pm 0,015
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,011 \pm 0,003 (0,006 — 0,016)	0,016 \pm 0,007	0,014 \pm 0,002	0,015 \pm 0,007

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 100 e 200 mg/kg, v.o., durante 90 dias. Os parâmetros bioquímicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média \pm D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle $\times 1,96$ é dado em parênteses.

Tabela 11 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar tratados por via oral com cartilagem de tubarão 100 e 200 mg/kg, durante 90 dias

PARÂMETROS	GRUPO			
	CONTROLE INICIAL	CONTROLE FINAL	TRATADO (100 mg/kg)	TRATADO (200 mg/kg)
Glicose (mg/dl)	83,1 ± 19,93 (44,0 — 122,1)	41,7 ± 16,42	59,4 ± 21,96	65,6 ± 14,29
AST (U/ml)	34,7 ± 9,53 (16,0 — 53,4)	40,7 ± 8,19	40,4 ± 8,45	44,4 ± 12,62
ALT (U/ml)	46,2 ± 10,23 (26,1 — 66,2)	67,5 ± 6,61*	59,5 ± 8,93	50,5 ± 7,80
Fosfatase alcalina (U/l)	113,7 ± 14,17 (85,9 — 141,4)	46,7 ± 12,73*	48,9 ± 10,04*	33,0 ± 8,61*
Creatinina (mg/dl)	0,65 ± 0,29 (0,08 — 1,22)	0,88 ± 0,36	0,84 ± 0,39	0,98 ± 0,42
Uréia (mg/dl)	68,6 ± 13,06 (43,0 — 94,2)	53,2 ± 4,77	58,8 ± 11,59	54,0 ± 8,06
Colesterol (mg/dl)	60,4 ± 16,63 (27,8 — 93,0)	68,6 ± 9,02	68,2 ± 3,76	59,4 ± 8,57
Triglicérides (mg/dl)	71,5 ± 16,33 (39,5 — 103,5)	51,2 ± 5,60	44,7 ± 4,76	51,7 ± 10,72
Lipídeos (mg/dl)	499,1 ± 210,03 (87,4 — 910,7)	381,5 ± 94,02	505,0 ± 120,27	598,2 ± 133,90

Os animais foram tratados com cartilagem de tubarão (CT) 500 mg/kg, v.o., durante 90 dias. Os parâmetros bioquímicos foram determinados antes e após o tratamento. Os valores representam média ± D.P.M. O Intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 12 - Estudo sobre a função reprodutora de ratas Wistar tratadas com cartilagem de tubarão (500 mg/kg/dia), durante 150 dias

Grupo/Dose/ Via de administração (n)	Nº de Natimortos	Nº de ratas com gestação a termo	Nº de ratos nascidos vivos	Peso corporal médio dos filhotes	Nº de ratas gestantes vivas
Controle (veículo) (n=6)	01	06	39	5,52 ± 0,06	06
CT 500 mg/kg, v.o. (n=6)	01	06	40	5,36 ± 0,08	06

Os animais foram tratados diariamente com cartilagem de tubarão (CT) 500 mg/kg, por via oral antes, durante e após o acasalamento, perfazendo um total de 150 dias (ANOVA e Fisher).

de 4 filhotes do grupo tratado (Figura 4). Após três meses de idade, dois filhotes machos do grupo tratado (CT 500 mg/kg, v.o.) apresentaram movimentos esteriotipados e ao fim de duas semanas morreram.

Com relação a 2^a geração de filhotes, no grupo das fêmeas acasaladas com machos, ambos provenientes de mães tratadas (CT 500 mg/kg, v.o.), apenas uma dentre as seis fêmeas não ficou grávida. O exame dos filhotes antes do desmame não revelou alterações visíveis. Contudo, após o desmame um dos filhotes apresentou uma diminuição no tamanho da cauda.

No grupo das fêmeas provenientes de mães tratadas (CT 500 mg/kg, v.o.) acasaladas com machos provenientes de mães sem tratamento, apenas uma dentre as cinco não ficou grávida. Não foram observadas alterações visíveis antes ou após o desmame. Em ambos os grupos, os filhotes apresentaram média de peso dentro dos valores normais registrados na literatura.

4.3 FARMACOLÓGICOS

4.3.1 Atividade antiinflamatória

4.3.1.1 Efeito da fração hidrossolúvel (FH), obtida da cartilagem de tubarão, sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos

Os resultados obtidos com a FH sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos encontram-se na Tabela 13.

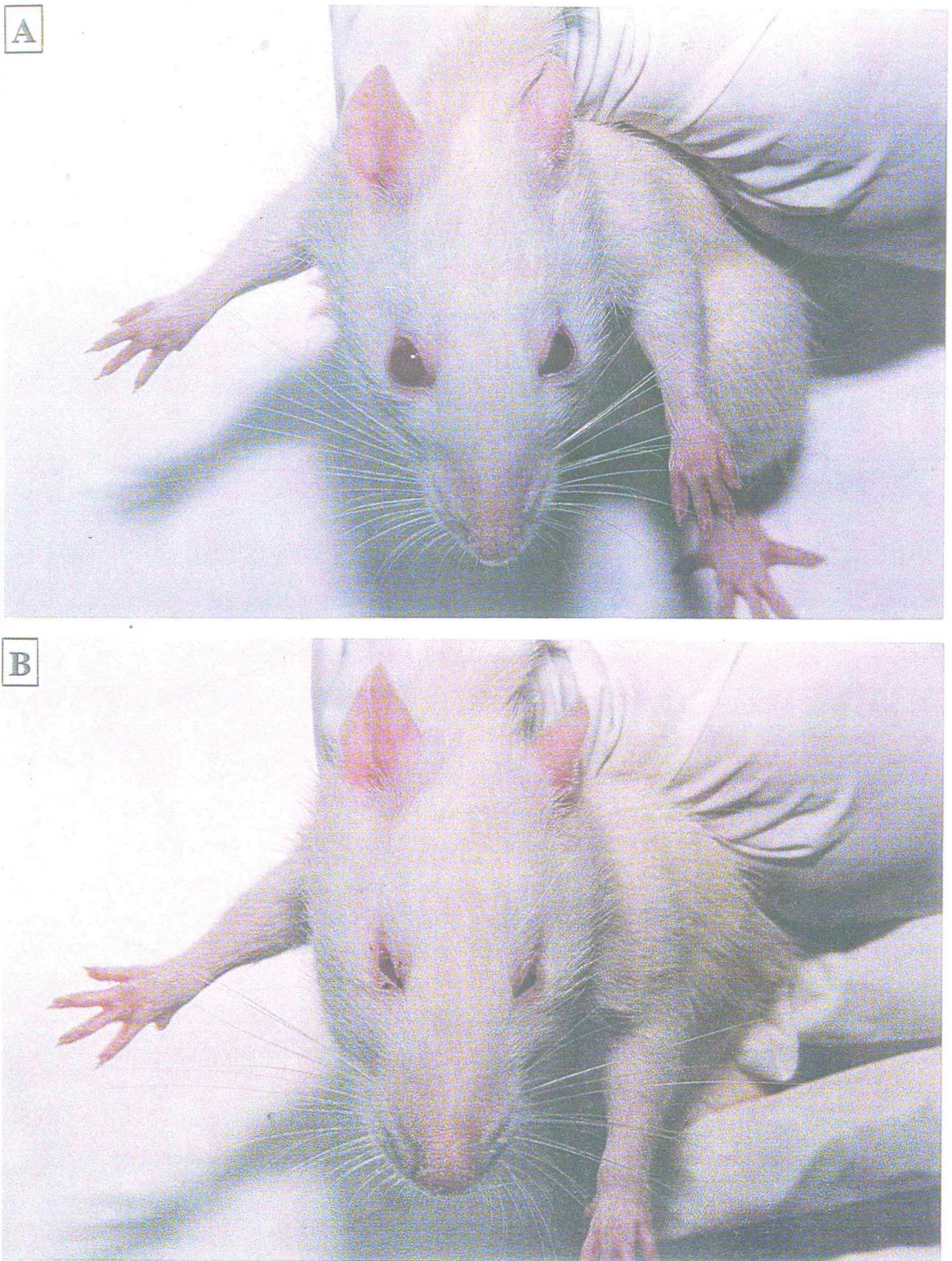


Figura 4 - Estudo toxicológico crônico da cartilagem de tubarão em ratos. Os animais (ratas Wistar) foram tratados diariamente com cartilagem de tubarão (CT 500 mg/kg, v.o.), por 150 dias, antes, durante e após o acasalamento. A parte superior da figura (A), mostra um rato normal, proveniente de uma mãe controle. A parte inferior (B), mostra um rato com alterações a nível ocular, proveniente de uma mãe tratada com CT 500 mg/kg, v.o.

A FH (20 mg/kg, v.o.) reduziu de maneira significativa ($P < 0,05$), o volume médio do edema (ml), observado na 2^a, 3^a (Figura 5) e 4^a hora após a injeção de carragenina ($0,77 \pm 0,09$; $1,18 \pm 0,13$ e $1,39 \pm 0,14$), quando comparada ao controle ($1,11 \pm 0,10$; $1,71 \pm 0,12$ e $1,93 \pm 0,13$ respectivamente), correspondendo a inibições de 30,6; 31,0 e 28,0% respectivamente. A FH na dose de 10 mg/kg, v.o. não foi efetiva em inibir o edema induzido pela carragenina em nenhum dos períodos observados. A indometacina (2 mg/kg, v.o.), um antiinflamatório padrão, reduziu de modo significativo ($P < 0,05$) o volume médio do edema (ml) em todos os períodos observados ($0,59 \pm 0,07$; $0,64 \pm 0,06$; $0,88 \pm 0,09$; $0,96 \pm 0,13$ e $0,31 \pm 0,06$), com exceção da 1^a hora, em relação ao controle ($0,78 \pm 0,09$; $1,11 \pm 0,10$; $1,71 \pm 0,12$; $1,93 \pm 0,13$ e $0,49 \pm 0,07$), correspondendo a inibições de 24,4; 42,3 48,5; 50,3 e 36,7% respectivamente.

4.3.1.2 Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos

Os resultados obtidos com a FH sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos encontram-se apresentados na Tabela 14.

A FH (10 mg/kg, v.o.) não apresentou nenhuma diferença significativa no volume médio (ml) do edema ($2,17 \pm 0,11$; $2,65 \pm 0,20$; $2,72 \pm 0,19$; $2,64 \pm 0,24$ e $2,26 \pm 0,15$) em relação ao grupo controle ($2,30 \pm 0,14$; $3,18 \pm 0,24$; $3,27 \pm 0,27$; $3,09 \pm 0,27$ e $2,99 \pm 0,26$) em nenhum dos períodos observados. Entretanto, na dose de 20 mg/kg, v.o., a FH reduziu de forma significativa ($P < 0,01$) o volume médio do edema (ml) nos períodos de 1/2; 1; 2 (Figura 6); 3 e 4 horas ($1,85 \pm 0,14$; $2,47 \pm 0,09$; $2,31 \pm 0,11$; $2,27 \pm 0,14$ e $2,11 \pm 0,18$) em relação ao controle, correspondendo a inibições de 19,6; 22,3; 29,4; 26,5 e 29,4% respectivamente. A ciproheptadina (10

Tabela 13 - Efeito da fração hidrossolúvel extraída da cartilagem de tubarão e da indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos

Grupo	Dose/Via de administração	Volume do edema (ml)					
		(n)	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Controle (veículo)	-	(13)	0,78 ± 0,09	1,11 ± 0,10	1,71 ± 0,12	1,93 ± 0,13	0,49 ± 0,07
FH	10 mg/Kg, v.o.	(10)	0,71 ± 0,07 (9%)	0,88 ± 0,07 (20,7%)	1,40 ± 0,08 (18,1%)	1,58 ± 0,11 (18,1%)	0,40 ± 0,04 (18,3%)
	20 mg/Kg, v.o.	(10)	0,61 ± 0,06 (21,8%)	0,77 ± 0,09* (30,6%)	1,18 ± 0,13* (31,0%)	1,39 ± 0,14* (28,0%)	0,35 ± 0,03 (28,6%)
Indometacina	2 mg/Kg, v.o.	(11)	0,59 ± 0,07 (24,4%)	0,64 ± 0,06* (42,3%)	0,88 ± 0,09* (48,5%)	0,96 ± 0,13* (50,3%)	0,31 ± 0,06* (36,7%)

A fração hidrossolúvel (FH), indometacina e o veículo (controle) foram administrados 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina (0,1 ml de uma solução a 1%, v/v). Os valores representam média ± E.P.M. do volume do edema nos períodos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção de carragenina. O percentual de inibição do edema em relação ao controle a cada período é dado em parênteses. * P < 0,05; comparado ao controle (ANOVA e Fisher).

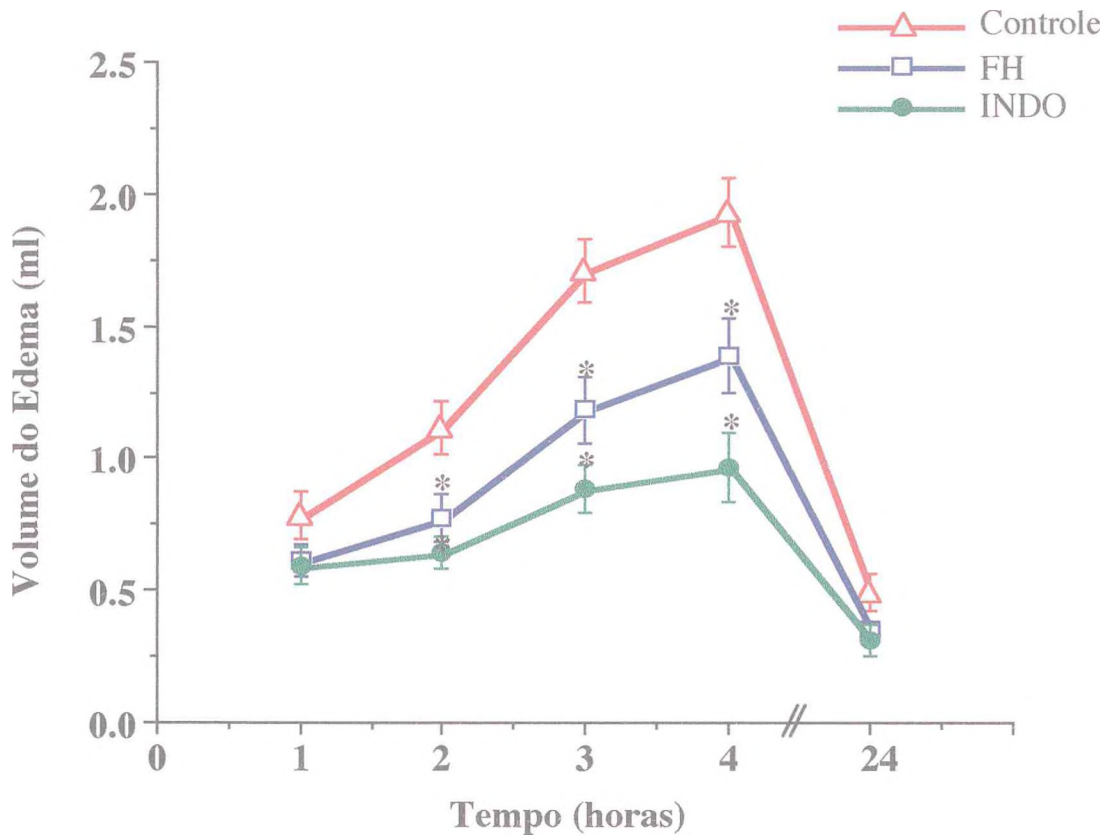


Figura 5 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, e da indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos . A FH (20 mg/kg, v.o.), indometacina (INDO 2 mg/kg, v.o.) e veículo foram administrados 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina 1%. Os valores representam média \pm E.P.M. do volume do edema medido na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 24^a após a injeção de carragenina. *P < 0,05, comparado ao controle (ANOVA e Fisher).

Tabela 14 - Efeito da fração hidrossolúvel da cartilagem de tubarão e da ciproheptadina sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Volume do edema (ml)				
		½ h	1 h	2 h	3 h	4 h
Controle (veículo)	- (18)	2,30 ± 0,14	3,18 ± 0,24	3,27 ± 0,27	3,09 ± 0,27	2,99 ± 0,26
FH	10 mg/kg, v.o. (12)	2,17 ± 0,11 (5,7%)	2,65 ± 0,20 (16,7%)	2,72 ± 0,19 (16,8%)	2,64 ± 0,24 (14,6%)	2,26 ± 0,15 (24,4%)
	20 mg/kg, v.o. (14)	1,85 ± 0,14* (19,6%)	2,47 ± 0,09* (22,3%)	2,31 ± 0,11* (29,4%)	2,27 ± 0,14* (26,5%)	2,11 ± 0,18* (29,4%)
Ciproheptadina	10 mg/kg, v.o. (6)	0,54 ± 0,06** (76,5%)	0,59 ± 0,06** (81,4%)	0,64 ± 0,05** (80,4%)	0,78 ± 0,05** (74,8%)	0,82 ± 0,04** (72,6%)

A fração hidrossolúvel (FH), a ciproheptadina e a salina 0,9% (controle) foram administrados 1 hora antes da injeção intraplantar de dextrano (0,1 ml de uma solução a 1,5%, v/v). Os valores representam média ± E.P.M. do volume do edema nos períodos de ½, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de dextrano. O percentual de inibição do edema em relação ao controle, a cada período é dado em parênteses. *P < 0,05 e **P < 0,01, comparado ao controle (ANOVA e Fisher).

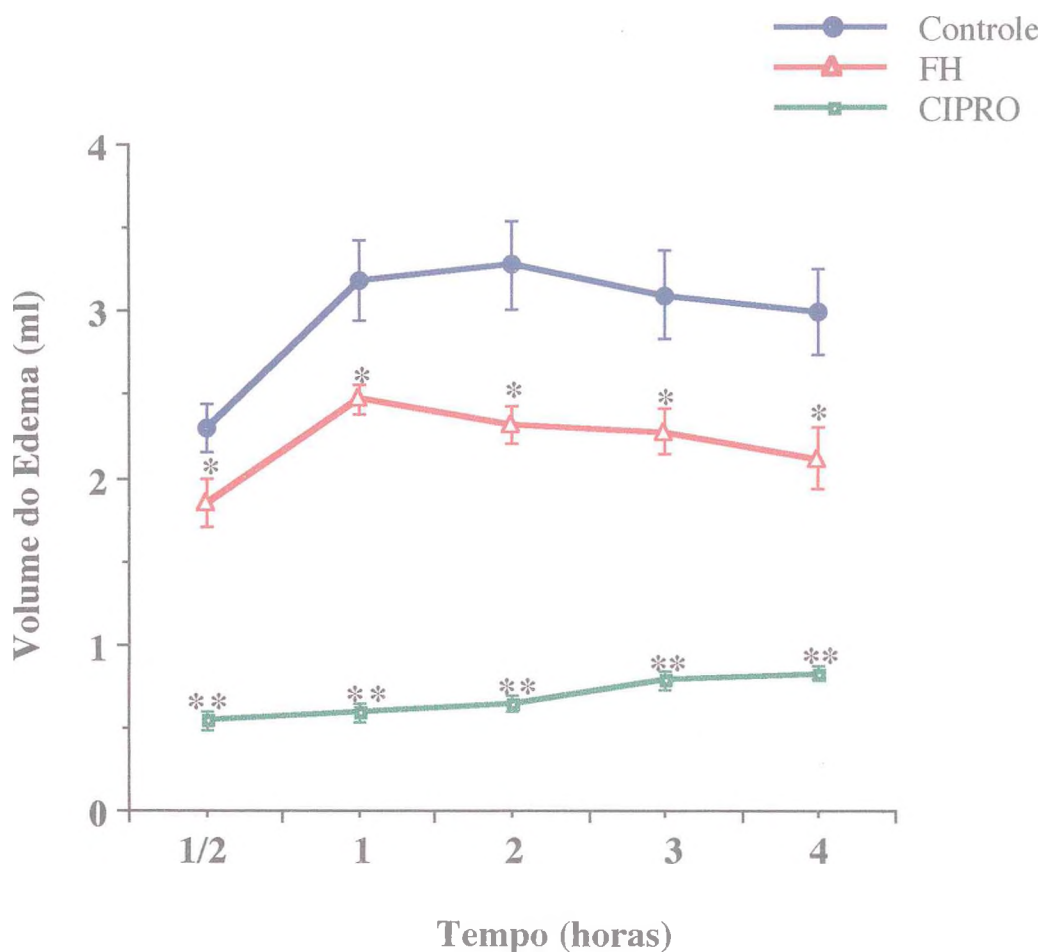


Figura 6 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, e da ciproheptadina sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos. A FH (20 mg/kg), a ciproheptadina (CIPRO, 10 mg/kg) e o veículo foram administrados por via oral, 1 hora antes da injeção intraplantar de dextrano 1,5%. Os valores representam média \pm E.P.M. do volume do edema medido nos períodos de 1/2, 1, 2, 3 e 4 hora, após a injeção de dextrano. *P < 0,05 e **P < 0,01 comparados ao controle (ANOVA e Fisher).

mg/kg, v.o.), utilizada como padrão, promoveu uma redução significativa ($P < 0,01$) do volume médio do edema (ml) em todos os períodos observados ($0,54 \pm 0,06$; $0,59 \pm 0,06$; $0,64 \pm 0,05$; $0,78 \pm 0,05$ e $0,82 \pm 0,04$), correspondendo a inibições de 76,5; 81,4; 80,4; 74,8 e 72,6% respectivamente, quando comparada ao grupo controle.

4.3.1.3 Efeito da fração hidrossolúvel (FH), obtida da cartilagem de tubarão, sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos

A Tabela 15 e a Figura 7, mostram os resultados obtidos com a fração hidrossolúvel (FH) sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos.

No grupo controle (água destilada, v.o.), o número médio de leucócitos totais ($\times 10^6$ células/ml) encontrados na cavidade peritoneal injetada com carragenina (300 μ g), foi de $3,7 \pm 0,49$; enquanto o número médio de neutrófilos ($\times 10^6$ células/ml) foi de $2,1 \pm 0,07$. Entretanto, no grupo de animais que não recebeu carragenina, o número de leucócitos totais foi de $0,6 \pm 0,11$, enquanto que para neutrófilos foi de $0,3 \pm 0,01$. A FH (10 e 20 mg/kg, v.o.) causou uma redução no número de leucócitos ($3,1 \pm 0,56$ e $2,6 \pm 0,25$) e no número de neutrófilos ($1,6 \pm 0,05$ e $1,2 \pm 0,02$) correspondendo a inibições de 17,7% (não significativa) e 30,1% ($P < 0,05$) respectivamente para leucócitos, e de 22,5 e 42,3% ($P < 0,05$) respectivamente para neutrófilos, comparadas ao grupo controle. A dexametasona (1 mg/kg, s.c.), usada como controle positivo, reduziu de forma significativa tanto o número de leucócitos totais ($2,5 \pm 0,20$; $P < 0,05$), quanto o de neutrófilos ($1,2 \pm 0,04$; $P < 0,01$), no foco inflamatório, correspondendo a inibições de 33,6 e 44,1% respectivamente, em relação ao grupo controle.

Tabela 15 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) e dexametasona na migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Estímulo	Leucócitos Totais (10 ⁶ céls/ml)	Neutrófilos (10 ⁶ céls/ml)	% de Inibição	
					Leucócitos	Neutrófilos
Não Tratado	- (6)	-	0,6 ± 0,11	0,3 ± 0,01	-	-
Controle (veículo)	- (6)	cg	3,7 ± 0,49	2,1 ± 0,07	-	-
FH	10 mg/kg, v.o. (6)	cg	3,1 ± 0,56	1,6 ± 0,05*	17,7	22,5
	20 mg/kg, v.o. (6)	cg	2,6 ± 0,26*	1,2 ± 0,02*	30,1	42,3
Dexametasona	1 mg/kg, s.c. (6)	cg	2,5 ± 0,20*	1,2 ± 0,04*	33,6	44,1

A fração hidrossolúvel e a salina 0,9% (controle) foram administradas 60 min, e a dexametasona 30 min antes da injeção de carragenina (Cg, 300 µg/animal/i.p.). Os resultados representam a celularidade expressa através da média ± E.P.M. *P < 0,05 comparados ao controle (ANOVA e Fisher).

4.3.1.4 Efeito da fração hidrossolúvel (FH), obtida da cartilagem de tubarão, sobre a migração de neutrófilos induzida por N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) na cavidade peritoneal de ratos

Na Tabela 16 e Figura 7 estão representados os efeitos da fração hidrossolúvel (FH) sobre a migração de neutrófilos induzida por FMLP na cavidade peritoneal de ratos.

O grupo de animais que não recebeu FMLP, apresentou um número médio de leucócitos totais ($\times 10^6$ células/ml) e neutrófilos ($\times 10^6$ células/ml) de $0,60 \pm 0,11$ e $0,29 \pm 0,01$ respectivamente. Por outro lado, no grupo controle (água destilada, v.o.) o número de leucócitos totais, encontrados na cavidade peritoneal injetada com FMLP (10^{-4} M), foi de $2,33 \pm 0,27$, enquanto o número médio de neutrófilos foi de $1,12 \pm 0,07$. A FH (10 e 20 mg/kg, v.o.) reduziu o número de leucócitos ($1,15 \pm 0,12$ e $0,85 \pm 0,12$) e o número de neutrófilos ($0,57 \pm 0,02$ e $0,40 \pm 0,02$) correspondendo a inibições significativas ($P < 0,01$) de 50,6 e 63,5% respectivamente para leucócitos totais, e de 49,1 e 64,3% respectivamente para neutrófilos, quando comparadas ao grupo controle. A dexametasona (1 mg/kg, s.c.), usada como controle positivo, reduziu de forma significativa ($P < 0,01$) o número de leucócitos em 61,4% ($0,90 \pm 0,17$) e número de neutrófilos em 64,3% ($0,40 \pm 0,01$), em relação ao grupo controle.

Tabela 16 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) e da dexametasona na migração de neutrófilos induzida por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) na cavidade peritoneal de ratos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Estímulo	Leucócitos Totais (10 ⁶ céls/ml)	Neutrófilos (10 ⁶ céls/ml)	% de Inibição	
					Leucócitos	Neutrófilos
Não Tratado	- (6)	-	0,60 ± 0,11	0,29 ± 0,01	-	-
Controle (veículo)	- (6)	FMLP	2,33 ± 0,27	1,12 ± 0,07	-	-
FH	10 mg/kg, v.o. (6)	FMLP	1,15 ± 0,12*	0,57 ± 0,02*	50,6	49,1
	20 mg/kg, v.o. (6)	FMLP	0,85 ± 0,12*	0,40 ± 0,02*	63,5	64,3
Dexametasona	1 mg/kg, s.c. (6)	FMLP	0,90 ± 0,17*	0,40 ± 0,01*	61,4	64,3

A fração hidrossolúvel e a salina 0,9% (controle) foram administradas 60 min, e a dexametasona 30 min antes da injeção de FMLP (10⁻⁴ M/animal/i.p.). Os resultados representam a celularidade expressa através da média ± E.P.M. *P < 0,01 comparados ao controle (ANOVA e Fisher).

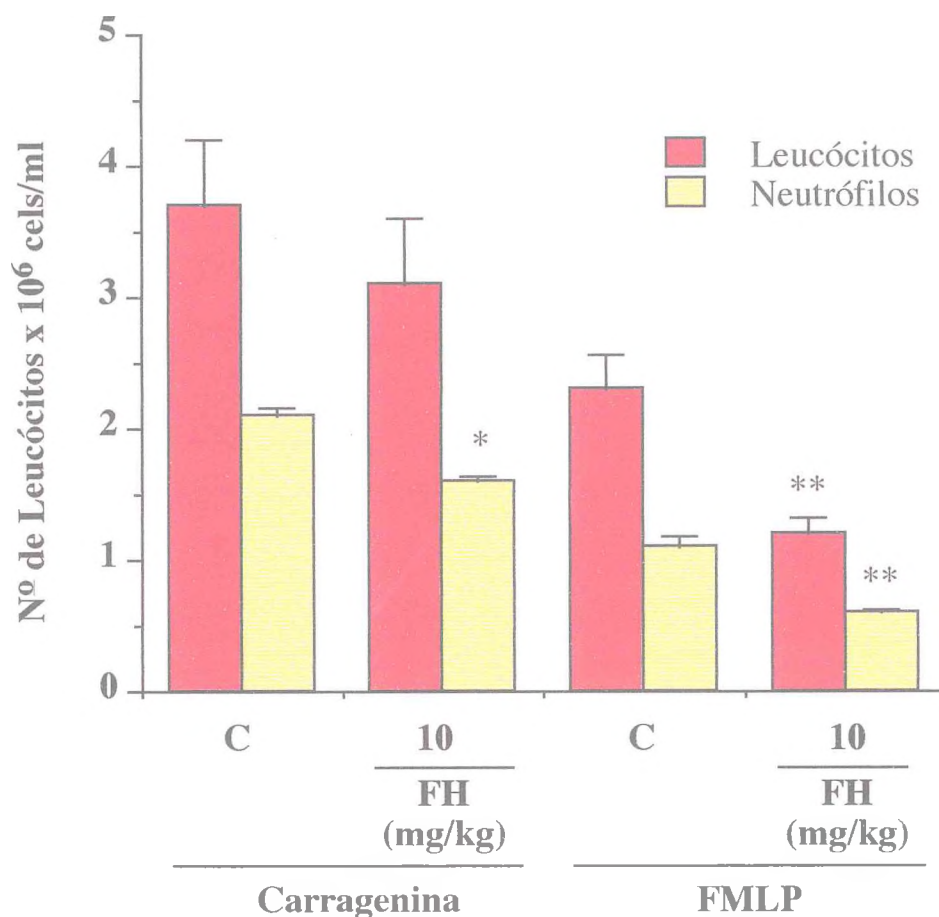


Figura 7 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão na migração de leucócitos induzida por carragenina ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) em ratos. A FH (10 mg/kg, v.o.) e salina 0,9% (controle - C) foram administradas 60 min antes da injeção de 1 ml carragenina (Cg 300 μ g/animal, i.p.) ou FMLP (10⁻⁴ M/animal, i.p.). Os valores representam média \pm E.P.M. do número de leucócitos e neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos. Foram utilizados 6 animais por grupo. *P < 0,05 e **P < 0,01 comparados ao controle (ANOVA e Fisher).

4.3.1.5 Efeito da FH obtida da cartilagem de tubarão na permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) em ratos

Está representado na Tabela 17, o efeito da administração oral da fração hidrossolúvel (FH), sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) em ratos.

A FH (2 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($P < 0,01$) o extravasamento do corante azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) induzido por serotonina ($18,58 \pm 2,72$) em relação ao controle ($38,34 \pm 2,64$), correspondendo a uma inibição de 51,54%. Entretanto, apenas a dose de 10 mg/kg da FH, administrada por via oral, foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,01$) o extravasamento do corante induzido por histamina ($9,37 \pm 0,75$), correspondendo a uma inibição de 51,25%, em relação ao controle ($19,22 \pm 1,99$). Nenhum efeito adicional sobre o extravasamento do corante induzido por serotonina foi detectado com a FH na dose de 10 mg/kg, v.o. ($19,23 \pm 1,27$), em relação ao grupo controle.

a) Estudo sobre o envolvimento do TNF-alfa no efeito inibitório da fração hidrossolúvel (FH) sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) em ratos

A fração hidrossolúvel (FH) (1 mg/kg, v.o.) não apresentou nenhuma diferença significativa no extravasamento do corante azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) induzido por histamina ($15,82 \pm 2,17$) ou serotonina ($32,14 \pm 6,03$), quando comparada ao controle (Hist.: $19,22 \pm 1,99$ e Serot.: $38,34 \pm 2,64$).

Embora a talidomida, um inibidor da síntese de TNF-alfa, na dose de 1 mg/kg, administrada subcutaneamente (s.c.), tenha reduzido significativamente ($P < 0,01$) o extravasamento do corante induzido por histamina ($12,78 \pm 1,03$) e serotonina ($13,66 \pm 1,25$), correspondendo a inibições de 33,51 e 64,37% respectivamente, quando comparada ao controle, a mesma não foi capaz de modificar de forma significativa, o efeito da FH (1 mg/kg, v.o.) quando administrada em associação (Hist.: $12,38 \pm 0,54$ e Serot.: $20,68 \pm 1,09$). Esses resultados encontram-se apresentados na Tabela 17.

4.3.2 Efeito da FH, obtida da cartilagem de tubarão, na angiogênese induzida por adjuvante completo de Freund (ACF) e óleo de cróton em ratos

A Tabela 18, mostra os resultados obtidos com a fração hidrossolúvel (FH) sobre a angiogênese induzida por ACF e óleo de cróton em ratos.

A FH (10 e 20 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($P < 0,01$) os valores de absorvância, em comprimento de onda de 490 nm ($0,68 \pm 0,06$ e $0,48 \pm 0,02$ respectivamente) quando comparados ao grupo controle ($1,69 \pm 0,03$), correspondendo a inibições de 59,8 e 71,6% respectivamente.

Tabela 17 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão e da talidomida na permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e serotonina em ratos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Extravasamento do corante ($\mu\text{g/ml}$)		
		Histamina	Serotonina	Salina
Controle (veículo)	- (12)	$19,22 \pm 1,99$	$38,34 \pm 2,64$	$11,48 \pm 0,82$
FH	1 mg/kg, v.o. (5)	$15,82 \pm 2,17$ (17,69%)	$32,14 \pm 6,03$ (16,17%)	-
	2 mg/kg, v.o. (6)	$16,57 \pm 2,57$ (13,79%)	$18,58 \pm 2,72^*$ (51,54%)	$9,67 \pm 1,35$ (15,77%)
	10 mg/kg, v.o. (6)	$9,37 \pm 0,75^*$ (51,25%)	$19,23 \pm 1,27^*$ (49,84%)	$9,97 \pm 0,45$ (13,15%)
Talidomida	1 mg/kg, s.c. (11)	$12,78 \pm 1,03^*$ (33,51%)	$13,66 \pm 1,25^*$ (64,37%)	$9,13 \pm 0,78$ (20,47%)
FH + Talidomida	1 mg/kg, v.o. + 1 mg/kg, s.c. (6)	$12,38 \pm 0,54^*$ (35,59%)	$20,68 \pm 1,09^*$ (46,06%)	$10,97 \pm 1,38$ (4,44%)

A fração hidrossolúvel (FH) e a salina 0,9% (controle) foram administradas 1 hora antes das injeções intradérmicas de histamina (0,2 mg) serotonina (1 mg) e salina, enquanto a talidomida foi administrada 15 minutos antes das injeções. Os valores representam média \pm E.P.M. do extravasamento do corante azul de Evans (50 mg/kg, e.v.). O percentual de inibição do extravasamento do corante, em relação ao controle é dado em parênteses. *P < 0,01, comparado ao controle (ANOVA e Fisher).

Tabela 18 - Medida da atividade antiangiogênica da fração hidrossolúvel (FH) extraída da cartilagem de tubarão em ratos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Absorbância a 490 nm	% de Inibição
Controle (veículo)	- (6)	1,69 ± 0,03	-
FH	10 mg/kg, v.o. (6)	0,68 ± 0,06*	59,8
	20 mg/kg, v.o. (6)	0,48 ± 0,02*	71,6

A fração hidrossolúvel e a água destilada (controle) foram administradas por via oral durante cinco dias consecutivos após a administração do adjuvante completo de Freund contendo 0,5% de óleo de cróton, nas bolsas de ar subcutâneas. Os valores representam média ± E.P.M. das absorbâncias do filtrado a 490 nm. *P < 0,01, comparado ao controle (ANOVA e Fisher).

4.3.2 Atividade antinociceptiva

4.3.2.1 Efeito da fração hidrossolúvel (FH), obtida da cartilagem de tubarão, na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos

A administração intraperitoneal (i.p.) da fração hidrossolúvel (FH) (0,5 e 1,0 mg/kg) reduziu significativamente ($P < 0,01$) o número de contorções abdominais ($15,8 \pm 1,91$ e $11,1 \pm 1,14$ respectivamente), em relação ao controle ($41,2 \pm 5,05$), correspondendo a inibições de 61,8 e 73,0% respectivamente (Tabela 19).

a) Estudo sobre o envolvimento do TNF-alfa na antinocicepção da fração hidrossolúvel (FH)

A FH, nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg, administrada oralmente reduziu o número de contorções abdominais ($29,8 \pm 3,20$; $21,6 \pm 2,41$ e $12,9 \pm 1,26$ respectivamente) quando comparada ao grupo controle ($41,2 \pm 5,05$), correspondendo a inibições de 27,7; 47,6 ($P < 0,05$) e 68,7% ($P < 0,01$) respectivamente.

A talidomida (0,5 mg/kg, s. c.) apresentou uma inibição não significativa no número de contorções abdominais ($31,4 \pm 2,29$) quando comparada ao controle ($41,2 \pm 5,05$). A mesma, não foi capaz de modificar de forma significativa, o efeito antinociceptivo da FH (0,5 e 1,0 mg/kg, v.o.) quando administradas em associação ($29,4 \pm 4,11$ e $21,0 \pm 6,32$) e comparadas a FH (0,5 e 1,0 mg/kg, v.o.) sozinha ($29,8 \pm 3,20$ e $21,6 \pm 2,41$ respectivamente). Esses resultados estão apresentados na Tabela 19 e Figura 8.

Tabela 19 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão e da talidomida no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Nº de Contorções	% de Inibição
Controle (veículo)	- (15)	41,2 ± 5,05	-
FH	0,5 mg/kg, v.o. (10)	29,8 ± 3,20	27,7
	1,0 mg/kg, v.o. (12)	21,6 ± 2,41*	47,6
	2,0 mg/kg, v.o. (8)	12,9 ± 1,26**	68,7
Talidomida	0,5 mg/kg, s.c. (8)	31,4 ± 2,29	23,8
	1,0 mg/kg, s.c. (5)	29,0 ± 3,63	28,0
FH + Talidomida	0,5 mg/kg, v.o. + 0,5 mg/kg, s.c.. (7)	29,4 ± 4,11	28,6
FH + Talidomida	1,0 mg/kg, v.o. + 0,5 mg/kg, s.c. (6)	21,0 ± 6,32*	47,9
FH	0,5 mg/kg, i.p. (8)	15,8 ± 1,91**	61,8
	1,0 mg/kg, i.p. (8)	11,1 ± 1,14**	73,0

A fração hidrossolúvel (FH) e a salina 0,9 % (controle) (v.o.) foram administradas 60 min, a FH (i.p.) 30 min e a talidomida (s.c.) 15 min, antes da injeção de ácido acético (0,6 %, i.p.). Os valores representam média ± E.P.M., do número de contorções apresentadas pelos animais, registrados durante um período de 20 min, iniciando 10 min após a injeção do ácido acético. *P < 0,05 e **P < 0,01, comparados ao controle (ANOVA e Fisher).

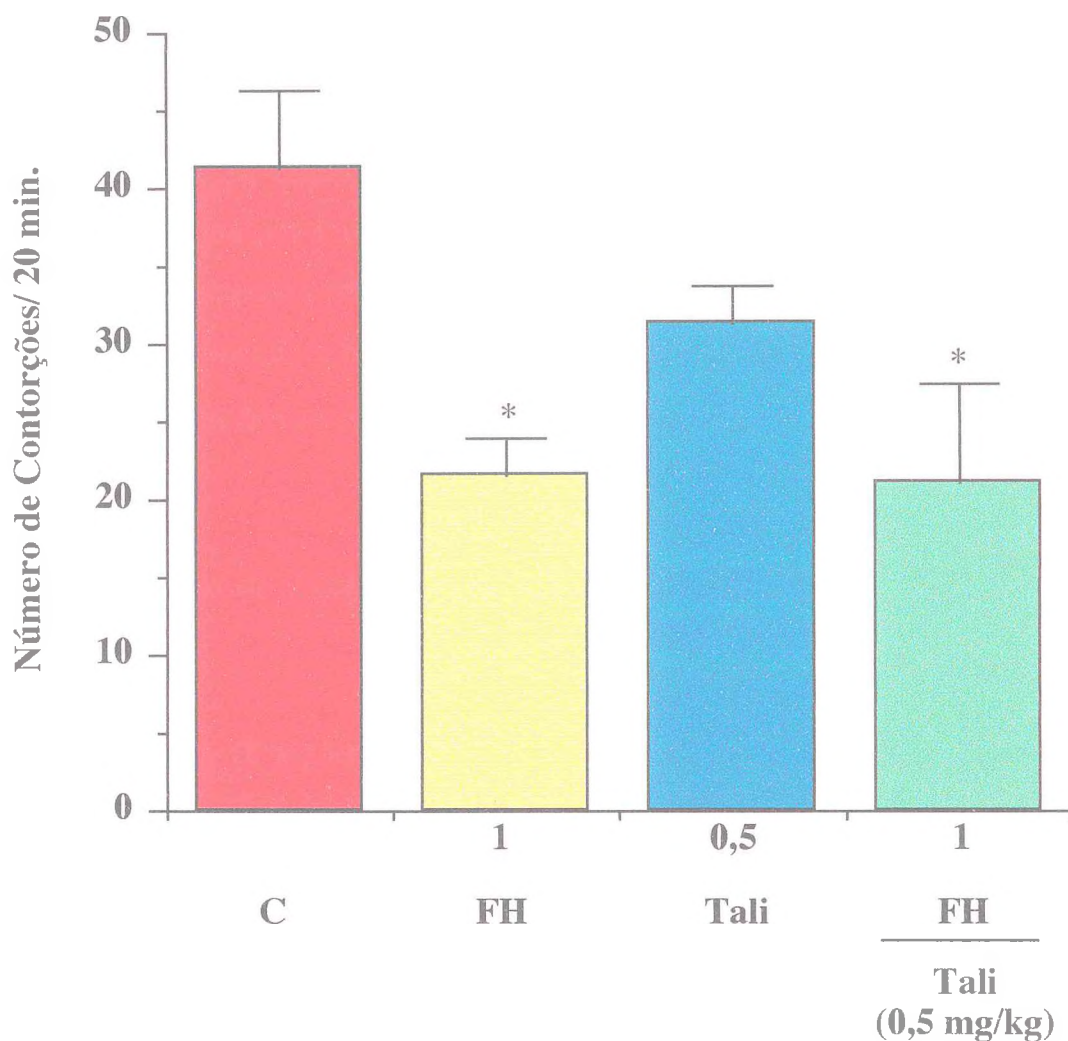


Figura 8 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, e da talidomida na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos. A FH (1,0 mg/kg, v.o.) e a salina 0,9% (controle - C) foram administradas 60 min antes, e a talidomida (Tali 0,5 mg/kg, s.c.) 15 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Os valores representam média \pm E.P.M. do número de contorções abdominais apresentadas pelos animais, registrados durante 20 min, iniciando 10 min após a injeção do ácido acético. * $P < 0,05$, comparados ao controle (ANOVA e Fisher).

4.3.3.2 Efeito da fração hidrossolúvel (FH), obtida da cartilagem de tubarão, na nocicepção induzida por formalina em camundongos

Na Tabela 20 está representado o efeito da fração hidrossolúvel (FH) na nocicepção induzida por formalina em camundongos. A FH (1 mg/kg) administrada por via oral, causou uma inibição significativa de 59,3% ($P < 0,01$) no tempo que o animal passou lambendo a pata, na segunda fase do teste (20 - 25 min) ($9,6 \pm 1,51$ seg) quando comparada ao controle ($23,6 \pm 1,70$ seg).

a) Estudo do papel do sistema opióide na antinocicepção da FH

A naloxona (2 mg/kg), administrada por via subcutânea (s.c.), não reverteu significativamente a nocicepção induzida pela FH (1 mg/kg, v.o.) na segunda fase ($11,7 \pm 1,2$ seg) quando comparada a FH sozinha ($9,6 \pm 1,51$ seg). Entretanto, a naloxona na mesma dose e via de administração promoveu uma reversão significativa ($P < 0,01$) do efeito antinociceptivo da morfina (5 mg/kg, s.c.). Esses resultados encontram-se apresentados na Tabela 20 e Figura 9.

b) Estudo do papel do óxido nítrico na antinocicepção da FH

Na Tabela 21 estão representados os resultados da administração intraperitoneal (i.p.) do L-NAME (18,7 e 37,5 mg/kg). Na dose de 37,5 mg/kg, i.p., o L-NAME causou uma redução significativa ($P < 0,05$) do tempo de lambadura da pata tanto na primeira ($53,2 \pm 1,93$ seg) quanto na segunda fase ($5,4 \pm 0,59$ seg),

Tabela 20 - Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH), extraída da cartilagem de tubarão, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Tempo (s)		% de Inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	- (8)	67,6 ± 3,5	23,6 ± 1,7	-	-
FH	1 mg/kg, v.o. (8)	65,5 ± 6,1	9,6 ± 1,5 ^a	-	59,3
Morfina	5 mg/kg, s.c. (8)	27,2 ± 3,1 ^a	0 ^a	59,8	100,0
FH + Naloxona	1 mg/kg, v.o. + 2 mg/kg, v.o. (8)	75,2 ± 5,5	11,7 ± 1,2 ^a	-	50,4
Morfina + Naloxona	5 mg/kg, s.c. + 2 mg/kg, s.c. (8)	72,3 ± 7,4 ^b	24,3 ± 1,7 ^b	-	-

A fração hidrossolúvel da cartilagem de tubarão (FH) e a salina 0,9% (controle) foram administradas 60 min, a morfina 30 min antes da injeção intraplantar de formalina 1% (20 µl). A naloxona foi administrada 15 min antes do tratamento com a FH ou morfina. Os resultados representam média ± E.P.M., do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrado no período de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase), após a injeção de formalina. a e b/ *P < 0,01 vs. controle e morfina, respectivamente (ANOVA e Fisher).

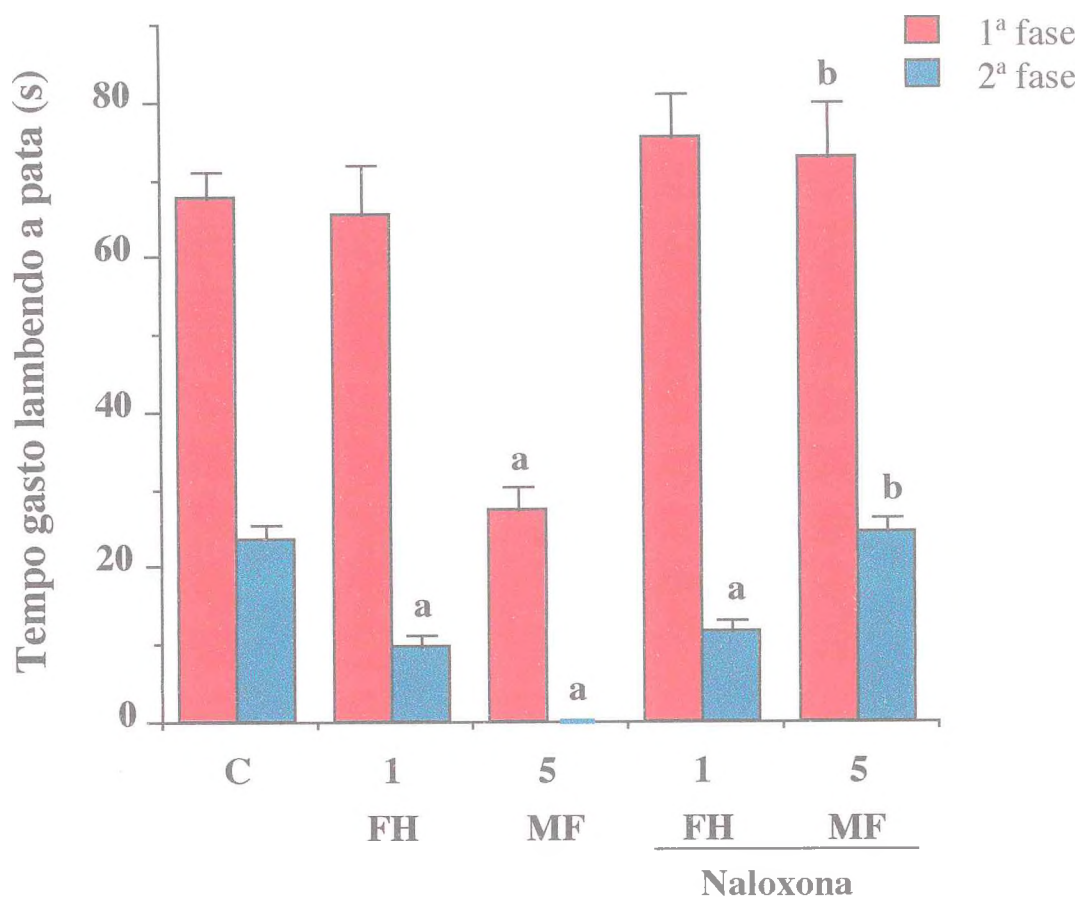


Figura 9 - Efeito da naloxona na antinociceção da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão e morfina no teste da formalina em camundongos. A FH (1 mg/kg, v.o.) e a salina 0,9% (controle - C) foram administradas 60 min antes, e a morfina (MF 5 mg/kg, s.c.) 30 min antes da injeção intraplantar de formalina 1%. A naloxona (2 mg/kg, s.c.) foi administrada 15 min antes do tratamento com FH ou MF. Os valores representam média \pm E.P.M. do tempo gasto pelos animais lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase) após a injeção de formalina. a, b/ $**P < 0,01$ vs. C e MF respectivamente (ANOVA e Fisher).

quando comparado ao controle (1ª fase: $71,9 \pm 2,71$ e 2ª fase: $22,9 \pm 1,47$ seg respectivamente). Contudo, o L-NAME na menor dose não influenciou de maneira significativa o tempo de lambedura na primeira fase do teste. O efeito antinociceptivo do L-NAME (37,5 mg/kg, i.p.) foi revertido pela L-arginina (400 e 800 mg/kg, i.p.) tanto na primeira ($69,0 \pm 4,37$ e $68,2 \pm 5,20$ seg respectivamente) quanto na segunda fase ($15,5 \pm 1,12$ e $30,7 \pm 2,49$ seg respectivamente).

O efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina administrada intraperitonealmente (i.p.), sobre a antinocicepção induzida pela FH, está representado na Tabela 21 e Figura 10. A FH (1 mg/kg, v.o.) teve seu efeito revertido significativamente ($P < 0,05$) de modo dose-dependente pela L-arginina nas doses de 400 e 800 mg/kg, i.p., na segunda fase ($19,1 \pm 2,04$ e $28,2 \pm 0,89$ seg respectivamente) quando comparado a FH sozinha ($12,3 \pm 0,92$ seg).

Na Tabela 22 estão representados os resultados da associação do L-NAME (10 mg/kg, i.p.) com a FH (0,5 e 1,0 mg/kg, v.o.). O L-NAME (10 mg/kg, i.p.) reduziu de modo não significativo em 21,3% a segunda fase ($13,3 \pm 1,44$ seg), em relação ao controle ($16,9 \pm 1,57$ seg), enquanto a FH (0,5 mg/kg, v.o.) também causou uma redução não significativa de 13,0%, na segunda fase ($14,7 \pm 1,48$ seg), em relação ao controle. Entretanto, a associação de ambas (FH 0,5 mg/kg, v.o. + L-NAME 10 mg/kg, i.p.) passou a produzir uma inibição significativa ($P < 0,01$) de 60,9% ($6,6 \pm 0,97$ seg) em relação ao controle, na segunda fase do teste (Figura 11). O mesmo foi observado quando associou-se a FH (1,0 mg/kg, v.o.) com o L-NAME (10 mg/kg, i.p.). A FH (1 mg/kg, v.o.) causou uma inibição significativa ($P < 0,01$) de 49,8% ($10,6 \pm 1,70$ seg) em relação ao controle ($21,2 \pm 2,96$ seg), enquanto o L-NAME (10 mg/kg, i.p.) causou uma inibição não significativa de 26,8% ($15,5 \pm 2,49$ seg) em relação ao controle, ambos na segunda fase. A associação da FH (1,0 mg/kg, v.o.) com L-NAME (10 mg/kg, i.p.) causou uma inibição de 74,8% ($5,3 \pm 0,88$ seg) em relação ao controle, na segunda fase do teste.

Tabela 21 - Avaliação do papel do óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Tempo (seg)		% de Inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	- (29)	71,9 ± 2,71	22,9 ± 1,47	-	-
FH	1 mg/kg, v.o. (22)	63,7 ± 5,47	12,3 ± 0,92 ^a	11,5	46,2
L-NAME	18,7 mg/kg, i.p. (18)	65,1 ± 4,12	13,0 ± 1,45 ^a	9,5	43,2
	37,5 mg/kg, i.p. (26)	53,2 ± 1,93 ^a	5,4 ± 0,59 ^a	26,0	76,6
L-Arginina	400 mg/kg, i.p. (12)	72,3 ± 3,63	30,7 ± 1,81 ^a	-	-
	800 mg/kg, i.p. (12)	68,3 ± 4,60	29,8 ± 1,79 ^a	5,2	-
L-NAME +	37,5 mg/kg, i.p. +				
L-Arginina	400 mg/kg, i.p. (6)	69,0 ± 4,37 ^b	15,5 ± 1,12 ^{a,b}	4,1	32,3
L-NAME +	37,5 mg/kg, i.p. +				
L-arginina	800 mg/kg, i.p. (12)	68,2 ± 5,20 ^b	30,7 ± 2,49 ^{a,b}	5,3	-
FH +	1 mg/kg, v.o. +				
L-arginina	400 mg/kg, i.p. (12)	73,3 ± 2,30	19,1 ± 2,04 ^c	-	16,7
FH +	1 mg/kg, v.o. +				
L-arginina	800 mg/kg, i.p. (12)	63,5 ± 5,42	28,2 ± 0,89 ^c	11,8	-

A fração hidrossolúvel (FH) e a salina 0,9% (controle) foram administradas 60 min, o L-NAME (18,7 e 37,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl de formalina 1% v/v. A L-arginina (400 e 800 mg/kg, i.p.) foi administrada 5 min antes do tratamento com L-NAME ou FH. Os valores representam média ± E.P.M., do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase) após a injeção de formalina. a, b e c/ *P <0,05 vs. controle, L-NAME (37,5 mg/kg, i.p.) e FH (1 mg/kg, v.o.), respectivamente (ANOVA e Fisher).

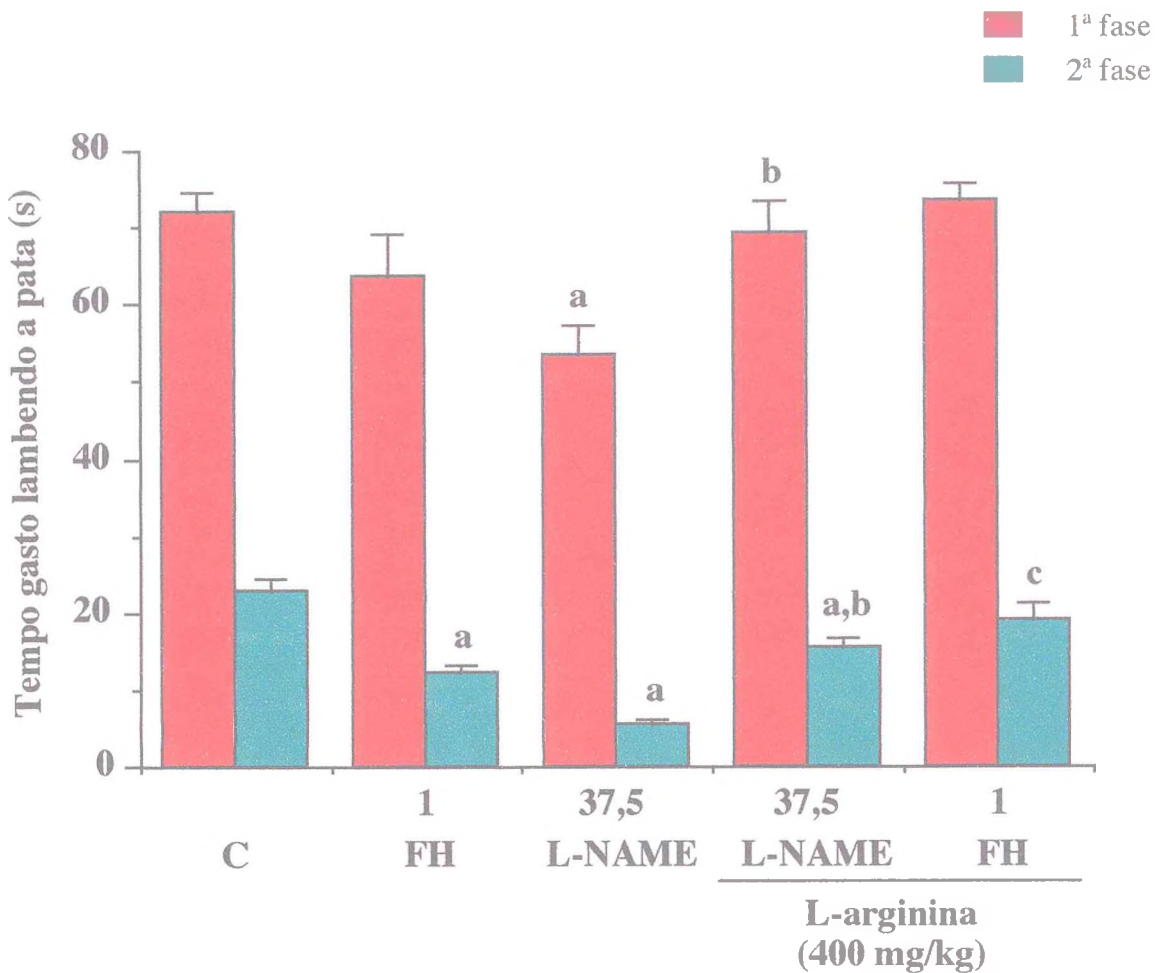


Figura 10 - Avaliação do papel do óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão na nocicepção induzida pela formalina em camundongos. A fração hidrossolúvel (FH 1 mg/kg, v.o.) e a salina 0,9% (controle - C) foram administradas 60 min antes, o L-NAME (37,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção intraplantar de formalina. A L-arginina (400 mg/kg, i.p.) foi administrada 5 min antes do tratamento com L-NAME ou FH. Os valores representam média \pm E.P.M., do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase) após a injeção de formalina. a, b e c * $P < 0,05$ vs. controle, L-NAME e FH respectivamente (ANOVA e Fisher).

Tabela 22 - Efeito da associação da FH extraída da cartilagem de tubarão, com L-NAME, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Tempo (seg)		% de Inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	- (24)	60,9 ± 3,63	16,9 ± 1,57	-	-
FH	0,5 mg/kg, v.o. (17)	66,7 ± 4,64	14,7 ± 1,48	-	13,0
	0,5 mg/kg, i.p. (17)	58,9 ± 3,66	12,0 ± 1,12 ^a	3,3	29,0
L-NAME	10 mg/kg, i.p. (18)	56,7 ± 4,20	13,3 ± 1,44	6,9	21,3
FH + L-NAME	0,5 mg/kg, v.o. + 10 mg/kg, i.p. (18)	54,6 ± 4,65	6,6 ± 0,97 ^{a,b,c}	10,3	60,9
Controle (veículo)	- (6)	65,0 ± 5,09	21,2 ± 2,96	-	-
FH	1,0 mg/kg, v.o. (8)	59,3 ± 4,20	10,6 ± 1,70 ^{a,b}	8,8	49,8
L-NAME	10 mg/kg, i.p. (6)	55,3 ± 3,69	15,5 ± 2,49	14,9	26,8
FH + L-NAME	1,0 mg/kg, v.o. + 10 mg/kg, i.p. (6)	67,2 ± 3,38	5,3 ± 0,88 ^{a,b,d}	-	74,8

A FH e a salina 0,9% (controle) foram administradas 60 min e o L-NAME 15 min antes da injeção intraplantar de 20µl de formalina 1%, v/v. No grupo FH + L-NAME, a FH foi administrada 45 min antes do L-NAME, administrado 15 min antes da formalina. Os valores representam média ± E.P.M., do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase), após a injeção de formalina. a, b, c e d/ *P < 0,05 vs. controle, L-NAME, FH (0,5 mg/kg, v.o.) e FH (1 mg/kg, v.o.) (ANOVA e Fisher).

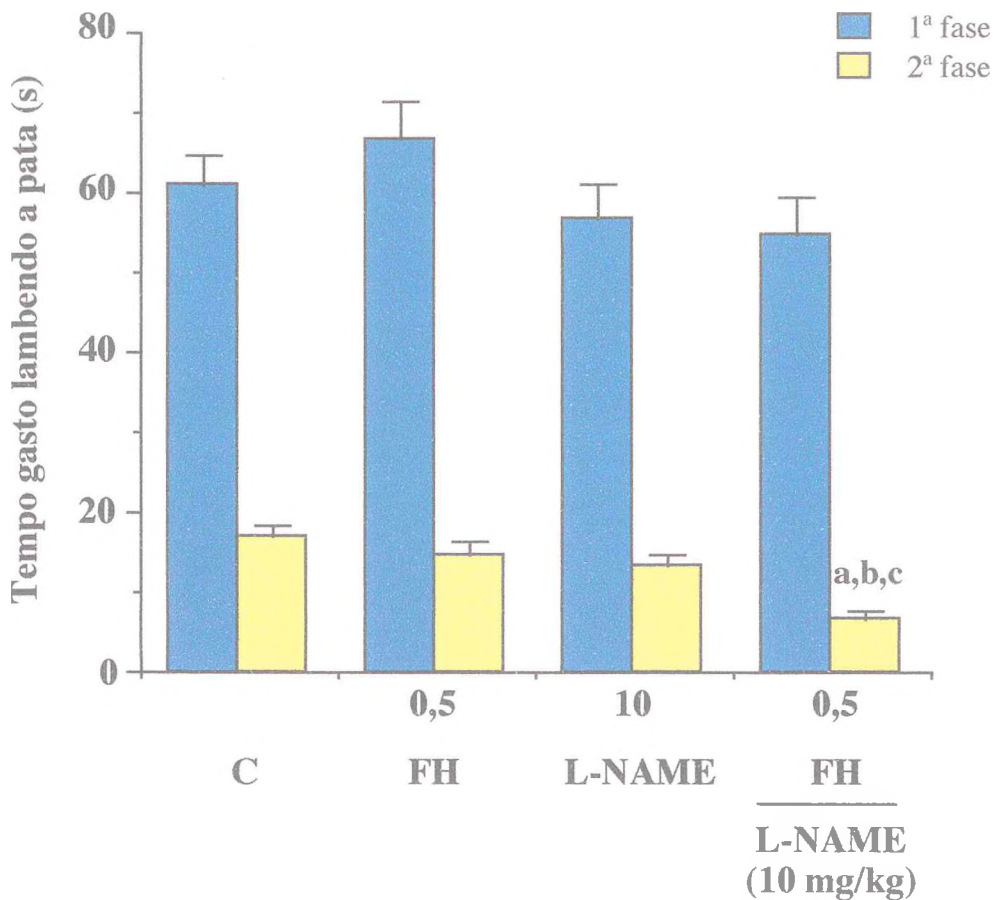


Figura 11 - Efeito da associação da fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão com L-NAME na nocicepção induzida pela formalina em camundongos. A fração hidrossolúvel (FH 0,5 mg/kg, v.o.) e a salina 0,9% (controle - C) foram administradas 60 min antes, e o L-NAME (10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção intraplantar de formalina. No grupo FH (0,5 mg/kg, v.o.) + L-NAME (10 mg/kg, i.p.), a FH foi administrada 45 min antes do L-NAME, administrado 15 min antes da formalina. Os valores representam média \pm E.P.M. do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase), após a injeção de formalina. a, b e c/ * $P < 0,01$ vs. controle, L-NAME e FH respectivamente (ANOVA e Fisher).

4.3.3.3 Efeito das frações semi-purificadas (FS) I e II obtidas da cromatografia da fração hidrossolúvel (FH) em coluna de gel de Sephadex G-100 na nocicepção induzida por formalina em camundongos

Na Tabela 23 e Figura 12 está representado o efeito das frações semi-purificadas (FS I e FS II) na nocicepção induzida pela formalina.

A FS I (0,25 e 0,5 mg/kg), administrada oralmente (v.o.), não modificou significativamente o tempo que o animal passou lambendo a pata na primeira ($63,8 \pm 2,64$ e $61,9 \pm 4,02$ seg respectivamente) assim como na segunda fase do teste ($21,4 \pm 2,66$ e $19,6 \pm 1,54$ seg respectivamente), em relação ao controle (1ª fase: $63,1 \pm 3,37$ seg e 2ª fase: $22,4 \pm 1,74$ seg).

A FS II na dose de 0,25 mg/kg, administrada por via oral (v.o.), não modificou significativamente a resposta nociceptiva induzida pela formalina em nenhuma das fases do teste. Entretanto, na dose de 0,5 mg/kg, v.o., a FS II reduziu de forma significativa ($P < 0,01$) o tempo de lambedura da pata na segunda fase do teste ($10,2 \pm 1,42$ seg) em relação ao controle ($22,4 \pm 1,74$ seg), correspondendo a uma inibição de 54,5%.

a) Estudo do papel do óxido nítrico no efeito das frações semi-purificadas (FS I e FS II) no teste da formalina

Ainda na Tabela 23, estão representados os resultados da associação do L-NAME (10 mg/kg, i.p.) com a FS I (0,5 mg/kg, v.o.) ou FS II (0,25 mg/kg, v.o.). O L-

Tabela 23 - Efeito da associação das frações semi-purificadas (FS I e FS II), obtidas da FH, com o L-NAME na nocicepção induzida pela formalina em camundongos

Grupo	Dose/ via de Administração (n)	Tempo (seg)		% de Inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	- (26)	63.1 ± 3.37	22.4 ± 1.74	-	-
FS I	0.25 mg/kg, v.o. (12)	63.8 ± 2.64	21.4 ± 2.66	-	4.5
	0.5 mg/kg, v.o. (26)	61.9 ± 4.02	19.6 ± 1.54	1.9	12.5
FS II	0.25 mg/kg, v.o. (26)	65.4 ± 3.36	19.8 ± 1.73	-	11.6
	0.5 mg/kg, v.o. (10)	54.3 ± 5.06	10.2 ± 1.42 ^a	13.9	54.5
L-NAME	10 mg/kg, i.p. (23)	63.0 ± 2.60	16.1 ± 1.36 ^a	-	28.1
FS I + L-NAME	0.5 mg/kg, v.o. + 10 mg/kg, i.p. (19)	60.8 ± 4.84	13.6 ± 1.39 ^{a,b,d}	3.6	39.3
FS II + L-NAME	0,25 mg/kg, v.o. + 10 mg/kg, i.p. (19)	65.3 ± 4.02	11.1 ± 1.53 ^{a,c,d}	-	50.5

As frações semi-purificadas (FS) I e II e a salina 0,9% foram administradas 60 min antes, e o L-NAME 15 min da injeção intraplantar de formalina 1% (20µl) v/v. Nos grupos FS I + L-NAME e FS II + L-NAME, ambas as frações foram administradas 45 min antes do L-NAME, administrado 15 min antes da formalina. Os valores representam média ± E.P.M., do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase), após a injeção de formalina. a, b, c e d/ P < 0,01 vs. controle, FS I (0,5 mg/kg, v.o.) FS II (0,25 mg/kg, v.o.) e L-NAME (ANOVA e Fisher).

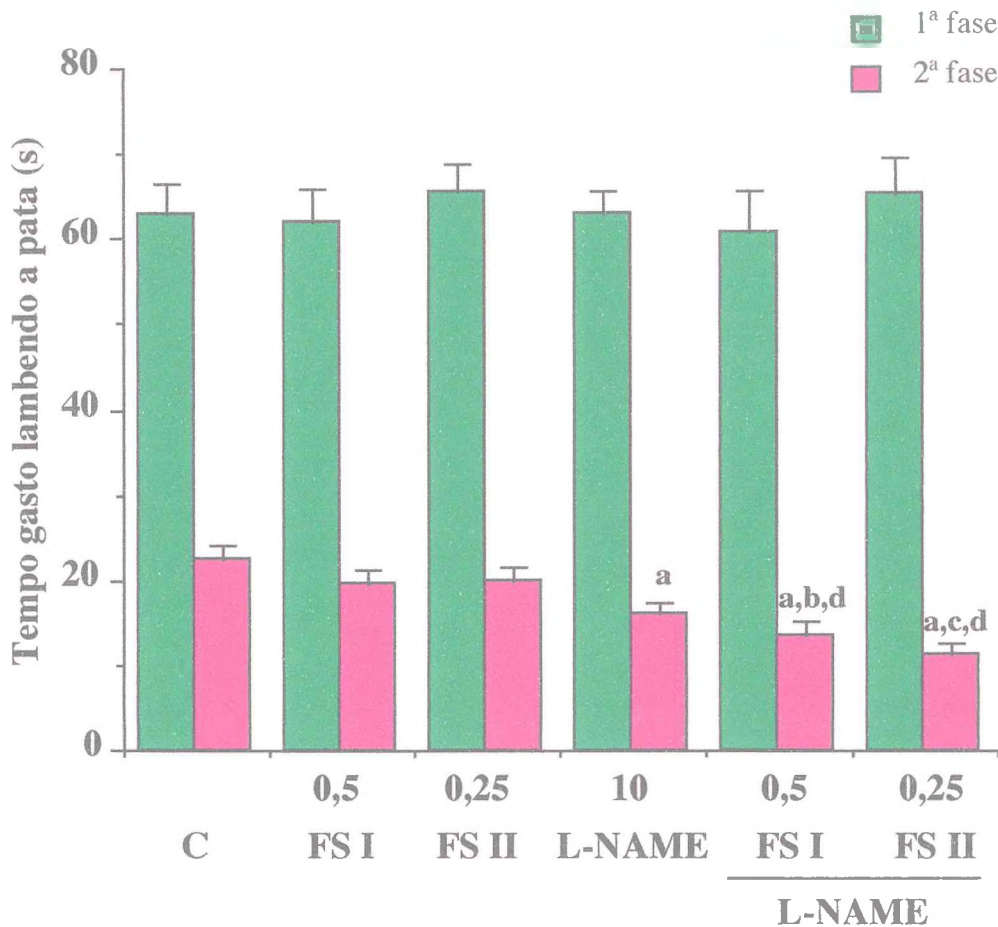


Figura 12 - Efeito da associação das frações semi-purificadas (FS I e FS II), obtidas da FH, com o L-NAME, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As frações I e II (FS I 0,5 mg/kg e FS II 0,25 mg/kg) e a salina 0,9% (controle - C) foram administrados por via oral, 60 min antes, e o L-NAME (10 mg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção intraplantar de formalina 1%. Nos grupos FS I + L-NAME e FS II + L-NAME, ambas as frações foram administradas 45 min antes do L-NAME, administrado 15 min antes da formalina. Os valores representam média \pm E.P.M. do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, registrados nos períodos de 0 - 5 min (1ª fase) e 20 - 25 min (2ª fase), após a injeção de formalina. a, b, c e d/ * $P < 0,01$ vs. controle, FS I (0,5 mg/kg, v.o.), FS II (0,25 mg/kg, v.o.) e L-NAME (10 mg/kg, i.p.) (ANOVA e Fisher).

NAME (10 mg/kg, i.p.) causou uma redução de 28,1% ($16,1 \pm 1,36$ seg), no tempo de lambadura da pata na segunda fase do teste, em relação ao controle ($22,4 \pm 1,74$ seg). A FS I (0,5 mg/kg, v.o.) e FS II (0,25 mg/kg, v.o.) quando associadas ao L-NAME (10 mg/kg, i.p.) promoveram inibições significativas ($P < 0,01$) de 39,3 e 50,5% na segunda fase ($13,6 \pm 1,39$ e $11,1 \pm 1,53$ seg respectivamente) quando comparadas ao controle ($22,4 \pm 1,74$ seg) (Figura 12).

4.3.3.4 Efeito da fração hidrossolúvel (FH), obtida da cartilagem de tubarão, no teste da placa quente em camundongos

A fração hidrossolúvel (FH) (1 e 10 mg/kg), administrada por via oral (v.o.), não modificou o tempo de reação à placa quente ($55 \pm 0,5^0$ C) em nenhum dos intervalos de tempo registrados, quando comparada ao controle (Tabela 24). Entretanto, a morfina (10 mg/kg, s.c.), um analgésico opióide padrão, promoveu um aumento significativo ($P < 0,01$) no tempo de reação nos intervalos de 30, 60 e 90 minutos após sua administração ($37,0 \pm 4,20$; $33,8 \pm 4,60$ e $29,0 \pm 5,37$ seg respectivamente), quando comparada ao controle ($21,2 \pm 2,22$; $18,9 \pm 3,10$ e $17,1 \pm 2,83$ seg respectivamente).

Tabela 24 - Efeito da fração hidrossolúvel (FH) extraída da cartilagem de tubarão (FH) e morfina no teste da placa quente em camundongos

Grupo	Dose/Via de administração (n)	Tempo de Reação (seg)			
		0 min	30 min	60 min	90 min
Controle	- (10)	21,1 ± 1,92	21,2 ± 2,22	18,9 ± 3,10	17,1 ± 2,83
FH	1 mg/kg, v.o. (10)	15,1 ± 1,20	19,1 ± 1,92	18,1 ± 2,11	14,8 ± 2,63
	10 mg/kg, v.o. (10)	18,1 ± 1,97	24,0 ± 2,72	16,2 ± 1,66	14,3 ± 2,02
Morfina	10 mg/kg, s.c. (10)	13,3 ± 2,04	37,0 ± 4,20*	33,8 ± 4,60*	29,0 ± 5,37*

A FH e a morfina foram administradas no tempo zero do teste (0 min). Os valores representam média ± E.P.M., do tempo de reação (em segundos), que consiste dos animais saltarem ou lamberem as patas traseiras após a colocação na placa quente ($55 \pm 0,5^{\circ}$ C), registrado antes (0 min) e 30, 60 e 90 min após o tratamento com as drogas. *P < 0,01 comparado ao controle (ANOVA e Fisher).

5 - DISCUSSÃO

A cartilagem de tubarão tem sido largamente utilizada, sob a forma de cápsulas, como suplemento alimentar, por pessoas que apresentam algum tipo de enfermidade crônica, incluindo várias formas de câncer, osteoporose, artrite reumatóide, osteoartrite e psoríase. O produto ganhou notoriedade com inúmeras referências de sucesso neste tipo de tratamento (LANE & COMAC, 1993); o que nos estimulou a investigar sua toxicidade e propriedades farmacológicas. Para tanto utilizamos a cartilagem de tubarão em forma de pó, a fração hidrossolúvel, de natureza proteica, extraída do pó da cartilagem, assim como frações semi-purificadas, também de natureza proteica (FSI e FSII), obtidas a partir da cromatografia da fração hidrossolúvel, em gel de Sephadex G-100.

A cartilagem de tubarão, nas doses de 1 e 2 g/kg, administrada por via oral ou intraperitoneal, não demonstrou toxicidade aguda para camundongos. Não foi possível determinarmos a DL_{50} devido a baixa solubilidade do produto em água. Apesar disso, a cartilagem de tubarão na maior dose testada (2 g/kg), administrada tanto por via oral como intraperitoneal, não apresentou sinais de toxicidade significativos ou mortes.

Da mesma forma, a cartilagem de tubarão na dose de 1 g/kg, administrada por via oral (v.o.), durante 30 dias consecutivos, não ocasionou alterações no comportamento dos animais ou mortes. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos do grupo tratado não diferiram significativamente dos valores do grupo controle.

O tratamento crônico de ratas Wistar com cartilagem de tubarão nas doses de 100, 200 e 500 mg/kg, v.o., promoveu um aumento nos níveis de uréia dos grupos tratados. Entretanto, os níveis de creatinina mantiveram-se dentro dos valores normais. As concentrações de uréia e creatinina em amostras de soro, são usadas para medir a função glomerular. Contudo, esses parâmetros são pouco sensíveis visto que

podem variar com a idade, dieta e peso corporal. As concentrações de uréia são ainda menos úteis que as de creatinina, para se avaliar a função renal (GAW et al., 1995), após a administração de drogas nefrotóxicas. Níveis reduzidos de uréia podem ser encontrados na desnutrição, enquanto um aumento nestes níveis podem ser associados à desidratação, diarreia, diabetes e infarto agudo do miocárdio (FISCHBACH, 1995).

Uma diminuição nos níveis de fosfatase alcalina, dos animais (machos e fêmeas) tratados com cartilagem de tubarão (100 e 200 mg/kg, v.o.), foi observada. Essa diminuição, no entanto, pode ser explicada pela idade dos animais no final do tratamento, pois sabe-se que os níveis de fosfatase alcalina decrescem com o aumento da idade (GAW et al., 1995).

A fosfatase alcalina é produzida por muitos tecidos, particularmente pelo fígado, ossos, intestinos, placenta e rins. Níveis elevados dessa enzima ocorrem na icterícia obstrutiva, câncer ou abscessos hepáticos, cirrose, hepatites e pancreatites. Em doenças ósseas como doença de Paget, osteomalácia e raquitismo, assim como no hiperparatireoidismo também são observados níveis elevados de fosfatase alcalina. Crianças em fase de crescimento, onde a atividade osteoblástica encontra-se aumentada, apresentam níveis elevados de fosfatase alcalina considerados normais. Níveis reduzidos de fosfatase alcalina, são encontrados na desnutrição, escorbuto e hipotireoidismo (LIMA et al., 1985; FISCHBACH, 1995; GAW et al., 1995).

Alguns dos parâmetros hematológicos dos animais machos tratados com cartilagem de tubarão (100 e 200 mg/kg, v.o.) mostraram-se levemente aumentados em relação ao controle. Contudo, esses valores mantiveram-se dentro dos padrões normais. Esse aumento pode estar associado à idade dos animais no final do tratamento.

A ausência de sinais de alta toxicidade em ratos tratados com cartilagem de tubarão, por via oral, está de acordo com dados registrados na literatura (LANE & COMAC, 1993).

Com relação à função reprodutora, a cartilagem de tubarão (500 mg/kg, v.o.) administrada a ratas Wistar por um período de 150 dias, não promoveu alterações significativas no que se refere à concepção e/ou gestação. Contudo, alguns filhotes apresentaram malformações como opacidade da córnea e diminuição no tamanho da fenda ocular. Essas alterações oculares podem estar relacionadas à atividade antiangiogênica atribuída à cartilagem de tubarão, visto que o olho é um órgão que possui uma grande quantidade de vasos sanguíneos.

A baixa toxicidade demonstrada pela administração oral da cartilagem de tubarão, nos proporcionou a oportunidade de explorá-la, assim como seus constituintes químicos, para fins terapêuticos. Desta maneira, experimentos foram realizados no sentido de estabelecermos suas propriedades farmacológicas.

A atividade antiinflamatória da fração hidrossolúvel (FH) obtida a partir da cartilagem de tubarão foi avaliada em ratos através de reconhecidos modelos de inflamação aguda, como o edema de pata induzido por carragenina ou dextrano, migração de leucócitos para cavidade peritoneal induzida por carragenina ou FMLP e permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina. O uso de diferentes modelos pode ser útil para esclarecer os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiinflamatória da droga em estudo.

A inflamação é a resposta do organismo, ou mais especificamente dos tecidos vascularizados, aos estímulos lesivos. O processo inflamatório envolve uma grande variedade de mediadores celulares e plasmáticos, com efeitos biológicos inter-relacionados.

Após desencadeada, a reação inflamatória pode apresentar três fases definidas como: fase aguda, fase crônica, que muitas vezes pode tornar-se prejudicial ao organismo, e fase de resolução, que ocorre devido à eliminação dos agentes causadores (MACKAY et al., 1985). A inflamação aguda apresenta sinais e sintomas que podem ser divididos nas seguintes categorias: eritema, edema, calor, dor e perda da função (KUEHL & EGAN, 1980). O aumento do fluxo sanguíneo na área lesada

se deve à ação de mediadores, preferencialmente, a nível arteriolar. Dentre esses mediadores citam-se a bradicinina, a histamina, as prostaglandinas da série E (PGE) e a prostaciclina (PGI₂). Alguns mediadores, como a bradicinina, causam vasodilatação através da liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; CHERRY et al., 1982; POHL et al., 1986; RUBANYI et al., 1986; VANHOUTTE, 1987; FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989). Foi demonstrado que o óxido nítrico é um dos fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (MONCADA et al., 1987; PALMER et al., 1987). Esse mediador é capaz de, localmente, causar relaxamento do músculo liso vascular através de um mecanismo dependente da ativação da guanilil ciclase, levando a formação de GMPc (IGNARRO, 1989). Foi também demonstrado que o óxido nítrico participa do controle do fluxo sanguíneo (FORTES et al., 1990) e da permeabilidade vascular induzida por difosfato de adenosina (ADP) e bradicinina (MAYHAN, 1992).

A inflamação aguda depende da liberação de mediadores que levam à formação de edema como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas da microcirculação local, e acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no foco inflamatório (WILLIAMS & MORLEY, 1973; WILLIAMS & PECK, 1977). Os leucócitos PMN têm um papel importante na remoção de microrganismos e restos celulares no foco da inflamação, podendo contribuir ainda no controle do efluxo de fluidos através das paredes dos vasos que levam a formação do edema (WEDMORE & WILLIAMS, 1981)

Muitos mediadores parecem estar envolvidos no edema de pata induzido por carragenina, incluindo histamina, serotonina, cininas e prostaglandinas (WILLIS, 1969 a e b). Estudos recentes mostram que o óxido nítrico endógeno pode ter um papel modulador no edema induzido por carragenina, através do aumento da biossíntese de prostaglandinas no sítio inflamatório (SAUTEBIN et al., 1995). Foi também demonstrado que dois inibidores da óxido nítrico sintase (N^G-Nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) e N^G-mono-metil-L-arginina (L-NMMA)) inibem de

forma dose-dependente o aumento da permeabilidade vascular e o edema induzido por carragenina, assim como o edema induzido por dextrano (IALENTI et al., 1992).

Di Rosa et al., 1971 demonstraram que a resposta vascular aguda do edema induzido por carragenina, envolve três etapas distintas: a primeira está relacionada com a liberação de histamina e serotonina, nos 90 min iniciais, a segunda, que ocorre entre 90 e 150 min, é mediada pela liberação de cininas como a bradicinina (BURCH & DeHAAS, 1990) e a última é decorrente da presença de prostaglandinas no exsudato, a partir de 150 min após a injeção de carragenina. A ação desses mediadores parece ser dependente da presença do sistema complemento.

A carragenina é um dos agentes flogísticos mais completos para se avaliar drogas antiinflamatórias, pois possui um elevado grau de reprodutibilidade, não exerce efeitos sistêmicos, não apresenta potencial antigênico, depende exclusivamente de um estímulo local, e sua reação inflamatória pode ser inibida por drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais (WINTER et al., 1962).

No modelo de edema de pata induzido por carragenina, a FH (20 mg/kg), administrada por via oral, reduziu o volume do edema significativamente na 2^a, 3^a e 4^a horas após a injeção de carragenina, tempo esse onde a liberação de cininas e prostaglandinas, assim como o infiltrado neutrofílico já é bastante expressivo. A indometacina, conhecido agente antiinflamatório não esteroidal, reduziu significativamente o edema a partir da 2^a hora após a injeção do agente flogístico. Desse modo, a FH parece inibir a liberação de cininas e prostaglandinas, assim como processos inflamatórios dependentes de leucócitos polimorfonucleares.

Na reação inflamatória induzida por dextrano ocorre, uma degranulação parcial de mastócitos dentro de cerca de 30 min, com consequente liberação de histamina e 5-hidroxitriptamina e um rápido acúmulo de fluidos com poucas proteínas e neutrófilos. A carragenina, em contraste, causa um progressivo acúmulo de exsudato rico em proteínas e com grande número de neutrófilos (LO et al., 1982).

No modelo de edema de pata induzido por dextrano, a FH (20 mg/kg) administrada oralmente, reduziu significativamente o edema em todos os períodos de tempo observados. A ciproheptadina, um antagonista dos receptores H₁ e 5-HT₂, também reduziu o edema, de modo significativo, em todos os períodos, embora de maneira mais pronunciada que a FH. É possível que a FH, ao inibir o edema por dextrano, o faça através de uma ação estabilizadora de membrana, exercida particularmente sobre a membrana dos mastócitos, prevenindo sua degranulação e consequente liberação de histamina e 5-hidroxitriptamina.

É sabido que a histamina e a 5-hidroxitriptamina são capazes de produzir vários dos eventos da inflamação, tais como aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Tendo-se em vista o efeito antiedematogênico da FH no edema de pata induzido por dextrano, resolvemos investigar seus efeitos sobre a permeabilidade vascular cutânea induzida por histamina e 5-hidroxitriptamina em ratos.

A FH (2 mg/kg, v.o.) reduziu de modo significativo o aumento da permeabilidade vascular cutânea induzido pela 5-hidroxitriptamina. Entretanto, apenas a maior dose da FH (10 mg/kg, v.o.) foi eficaz em reduzir significativamente, o aumento da permeabilidade vascular cutânea induzido por histamina. Contudo, nessa dose a FH não promoveu redução adicional do aumento da permeabilidade vascular cutânea induzida por 5-hidroxitriptamina em relação a dose de 2 mg/kg, v.o. A talidomida (1 mg/kg, s.c.) reduziu de forma significativa o aumento da permeabilidade vascular cutânea induzido por ambos os estímulos.

A talidomida, um conhecido inibidor da síntese do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (SAMPAIO et al., 1992; MOREIRA et al., 1993; SAMPAIO et al., 1993; STIRLING, 1996), tem sido utilizada com sucesso, em condições inflamatórias agudas, como o eritema nodoso da lepra (SAMPAIO et al., 1993), que geralmente estão associadas com a liberação de citocinas. Tem sido proposto, baseado em achados laboratoriais, que a talidomida além de possuir atividade antiinflamatória, pode ser também um inibidor da angiogênese (D'AMATO et al., 1994).

A cartilagem de tubarão contém substâncias que também inibem a angiogênese (LEE & LANGER, 1983; OIKAWA et al., 1990). Com base nessas informações, utilizamos a talidomida em associação com a FH para avaliarmos se o efeito antiinflamatório desta última, na permeabilidade vascular cutânea, poderia ser devido a uma possível inibição da síntese do TNF-alfa. Entretanto, o efeito da FH não foi potencializado pela talidomida e portanto, nesse modelo para avaliar drogas antiinflamatórias, o efeito da FH parece ser independente da inibição da síntese de TNF-alfa.

Os modelos que utilizam a carragenina, têm sido considerados como os que melhor indicam a atividade antiinflamatória de compostos para o uso na clínica (OTTERNESS et al., 1988). Baseado no efeito inibitório da FH sobre o edema de pata induzido por carragenina, resolvemos então investigar seus efeitos sobre a migração de leucócitos polimorfonucleares induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos. À semelhança da dexametasona, a FH (10 e 20 mg/kg, v.o.) mostrou-se eficaz em inibir o acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos.

O efeito da FH sobre a migração de leucócitos polimorfonucleares induzida por FMLP, também foi avaliado. Nesse modelo, a FH (10 e 20 mg/kg, v.o.), assim como a dexametasona, também mostrou efeito inibitório sobre o acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal.

A resposta inflamatória celular é um dos mecanismos pelos quais o organismo se defende de agentes lesivos e repara o tecido danificado. Muitas células envolvidas nessa resposta já estão presentes nos tecidos, como as células endoteliais, mastócitos, células mononucleares residentes (macrófagos teciduais e linfócitos), etc, enquanto outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e as células mononucleares (monócitos e linfócitos).

Esse processo de migração dos PMN envolve diversos eventos que seguem basicamente os seguintes passos: 1^o - “rolling” (deslizamento) dos leucócitos pela

parede do vaso, através de interações de baixa afinidade entre leucócitos e células endoteliais; 2º - ativação dos leucócitos por ação de agentes quimiotáticos ou integrinas; 3º - adesão de alta afinidade devido à mudança conformacional do leucócito por ação de integrinas; 4º - migração de leucócitos do lúmen vascular para o espaço extravascular (SMITH et al., 1988; 1991; BEVILACQUA et al., 1989; MACKAY & IMHOF, 1993).

As células endoteliais desempenham um importante papel na regulação da migração de leucócitos. Essas células, quando expostas a mediadores inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrieno B₄ (LTB₄) e quinto componente do sistema complemento (C5a), tornam-se mais aderentes para PMN (LUSCINSKAS et al., 1991; BEVILACQUA et al., 1994). Acredita-se que esse fenômeno seja decorrente de interações específicas entre moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas superfícies das células endoteliais (BEVILACQUA et al., 1989; BEVILACQUA, 1993; OSBORNE, 1990).

Dentre as moléculas de adesão, destacam-se a L-selectina, que é constitutivamente expressa por todos os leucócitos e desaparece dos mesmos assim que se inicia a adesão firme destes ao endotélio; a E-selectina (ELAM-1), que é expressa somente pelas células endoteliais; as integrinas- β_2 , que estão presentes constitutivamente na membrana dos polimorfonucleares, e a superfamília das imunoglobulinas (ZIMMERMAN et al., 1992; BEVILACQUA et al., 1994).

Além das células endoteliais, os mastócitos, macrófagos teciduais e células da musculatura lisa também podem regular a migração neutrofílica através da produção de mediadores inflamatórios (CYBULSKY et al., 1989).

A migração de polimorfonucleares é multimedida, ou seja, vários mediadores liberados no foco inflamatório são quimioatraentes para estas células. A participação de fragmentos do sistema complemento, como o C5a, estimulando a migração de neutrófilos para o foco inflamatório é bem conhecida (WHALEY & FERGUSON,

1981). O LTB₄, um metabólito do ácido araquidônico formado por ação das enzimas lipoxigenases, também apresenta potente atividade quimiotática para neutrófilos. Além dessas, outras substâncias são descritas como quimiotáticas para essas células, entre as quais destacam-se o PAF, fragmentos da parede de bactérias, peptídeos sintéticos (FMLP) e citocinas como a IL-1, TNF-alfa e IL-8 (ZIMMERMAN et al., 1992; FACCIOLI et al., 1990; RIBEIRO et al., 1991) e fator quimiotático para neutrófilos derivado de macrófagos (MNCF) (CUNHA & FERREIRA, 1986).

A FH, à semelhança da dexametasona, inibiu a migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos, induzida por carragenina, que se dá por um mecanismo indireto, via liberação de fatores quimiotáticos para neutrófilos por células residentes, assim como a migração de neutrófilos induzida por FMLP, que é considerado um estímulo direto, visto que não depende de células residentes para produzir quimiotaxia.

O efeito inibitório da dexametasona, sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina, se deve ao bloqueio da liberação de fatores quimiotáticos por células residentes (CUNHA & FERREIRA, 1986; FACCIOLI et al., 1990; RIBEIRO et al., 1991), pois sabe-se que os glicocorticóides são inibidores clássicos da liberação de muitas citocinas (FANTUZZI & GHEZZI, 1993).

Não se sabe ao certo, o mecanismo pelo qual o FMLP induz migração de neutrófilos. Alguns autores sugerem que este seja mediado por produtos da lipoxigenase (BHATTACHERJEE & PATTERSON, 1990). Contudo, trabalhos mais recentes mostram que os metabólitos do ácido araquidônico provavelmente não estão envolvidos na migração de neutrófilos induzida pelo FMLP, visto que inibidores da cicloxigenase e lipoxigenase não apresentaram efeito inibitório sobre este processo (RIBEIRO et al., 1997). Os autores ainda sugerem que a migração de neutrófilos induzida por FMLP parece estar relacionada à formação de um gradiente haptotático, que é definido como sendo um gradiente produzido em resposta a uma substância atrativa (IL-8 ou FMLP) ligada a um substrato localizado na superfície das células endoteliais e/ou à matriz extracelular.

O bloqueio da adesão de neutrófilos ao endotélio tem sido sugerido como mecanismo de ação dos glicocorticóides (MICHEL & WHORTON, 1951 ; MOON & TERSHAKOVIC, 1953; ALLISON et al., 1955). Entretanto, experimentos *in vitro* não apóiam essas evidências (FORSYTH & TALBOLT, 1992; CRONSTEIN et al., 1992). Além disso, foi demonstrado que a dexametasona não inibe o “rolling” nem a adesão de neutrófilos ao endotélio, induzidos *in vivo* por FMLP, nem a penetração dos neutrófilos através das junções das células endoteliais (ODA & KATORI, 1992; MANCUSO et al., 1995).

De acordo com os resultados apresentados pela FH, na migração de neutrófilos, podemos sugerir que sua ação antiinflamatória seja dependente não só do bloqueio da síntese de prostaglandinas, como também da síntese e liberação de mediadores inflamatórios como a IL-1, IL-8, TNF-alfa, LTB₄ e C5a, ou até mesmo de uma possível inibição de uma das etapas envolvidas na migração de neutrófilos, visto que a FH foi mais eficaz em inibir a migração induzida pelo FMLP, que àquela induzida por carragenina.

Considerando o uso de frações obtidas da cartilagem de tubarão na angiogênese, resolvemos investigar o efeito da FH no modelo de angiogênese segundo o método de KIMURA et al. (1985). Esse método, permite avaliar o efeito de substâncias sobre a angiogênese, no processo de inflamação crônica induzido pelo adjuvante completo de Freund contendo óleo de cróton.

A importância da angiogênese para o desenvolvimento de tumores tem sido aceita por muitos anos, na verdade desde o final do século passado (KREGBER, 1927; THIESSEN, 1936). Entretanto, o conceito do envolvimento desse processo em doenças inflamatórias como a osteoartrite, é relativamente novo (BROWN et al., 1983; BROWN & WEISS, 1988).

A idéia de que substâncias difusíveis pudessem ser capazes de induzir angiogênese anormal na retina, levando à cegueira (MICHAELSON, 1948), e o isolamento de fatores angiogênicos a partir de tumores (FOLKMAN et al., 1971) e

do fluido sinovial de humanos (WEISS et al., 1979), levou à conclusão de que a angiogênese anormal não é um processo exclusivo dos tumores, mas está também envolvida em doenças como a retinopatia diabética, artrite reumatóide e osteoartrite.

Tem sido demonstrado, que na artrite reumatóide, a angiogênese é estimulada por macrófagos que secretam TNF-alfa (LEIBOVICH et al., 1987; FRATER-SCHRODER et al., 1987). Contudo, além do TNF-alfa, diversas enzimas, como as metaloproteinases, parecem desempenhar um papel importante nesse processo (WEISS et al., 1983).

A literatura descreve, que frações isoladas da cartilagem de tubarão, possuem efeito antiangiogênico (LEE & LANGER, 1983; OIKAWA et al., 1990). Além disso, produtos a base de cartilagem têm sido testados, com sucesso, no tratamento da osteoartrite e artrite reumatóide (PRUDDEN & BALASSA, 1974; RAUIS, 1991).

A FH (10 e 20 mg/kg, v.o.), foi capaz de reduzir significativamente, a angiogênese induzida por adjuvante completo de Freund e óleo de cróton em ratos. É possível que esse efeito esteja relacionado à inibição de enzimas, como proteases e metaloproteinases, importantes no processo de indução da angiogênese.

Esses dados são corroborados por pesquisas recentes feitas com o Neovastat[®], uma fração hidrossolúvel obtida da cartilagem de tubarão, que atualmente encontra-se em fase de testes clínicos no Canadá e Estados Unidos, e tem demonstrado ser um potente inibidor de metaloproteinases, além de possuir um efeito citostático sobre células endoteliais e diversas linhagens de células tumorais.

Diante da atividade antiinflamatória apresentada pela FH, em diversos modelos de inflamação, resolvemos investigar seu efeito em diferentes testes nociceptivos, a saber contorções abdominais pelo ácido acético, formalina e placa quente. O uso de diferentes estímulos nociceptivos é útil na avaliação de uma droga, pois produz no animal a percepção do fenômeno doloroso com diferentes

características, revelando assim, a verdadeira natureza antinociceptiva da substância em questão.

O teste das contorções abdominais é baseado na aplicação de um estímulo fásico de alta intensidade. O ácido acético induz dor indiretamente, produzindo inflamação aguda na área peritoneal (NORTHOVER, 1963; GYIRES & KNOLL, 1975). Um considerável aumento nos níveis de prostaglandinas E_2 e F_{2a} no fluido peritoneal, após a injeção intraperitoneal de ácido acético é relatado (DERAEDT et al., 1976, 1980). Outros componentes inflamatórios, além das prostaglandinas, podem ser responsáveis pelas contorções induzidas por ácido acético, como é caso do envolvimento do componente simpático (DUARTE et al., 1988). Além disso, a injeção intraperitoneal desse ácido, produz um aumento da permeabilidade vascular nos vasos sanguíneos peritoneais no momento do aparecimento da primeira contorção (GYIRES & TORMA, 1984).

A FH, administrada por via oral ou intraperitoneal, foi eficaz em inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Embora esse efeito represente uma antinocicepção periférica, esse modelo é considerado pouco específico, visto que muitas drogas como hipotensores (PETTIBONE & MULLER, 1981), anti-histamínicos (YEH, 1986) e depressores do sistema nervoso central (TAKAHASHI & PAZ, 1987) podem bloquear as contorções induzidas pelo ácido acético. Além disso, a resposta nociceptiva nesse modelo não é duradoura, impossibilitando assim a avaliação dos possíveis mecanismos modulatórios envolvidos.

Uma grande variedade de mediadores químicos, que atuam em neurônios nociceptores, são produzidos por células não neuronais durante a inflamação. A descarga desses neurônios é controlada pela atividade de canais iônicos da membrana. Esses mediadores podem ser classificados em dois tipos: agentes ativadores diretos e agentes hiperalgésicos ou sensibilizadores de nociceptores (MONCADA et al., 1978). Parece pouco provável, que a sensibilização de nociceptores não seja um fator importante nas muitas formas de dor inflamatória.

Produtos do metabolismo do ácido araquidônico, como as prostaglandinas E₂, D₂ e I₂, são liberados por uma grande variedade de tecidos, durante a inflamação. De uma maneira geral, as prostaglandinas não ativam os nociceptores diretamente, mas os sensibilizam a outros estímulos. Essa ação das prostaglandinas parece ser importante no desenvolvimento da hiperalgisia periférica (RANG et al., 1991). Os leucotrienos também parecem desempenhar um papel na sensibilização dos nociceptores. O leucotrieno B₄ (LTB₄), assim como outros leucotrienos, não atuam diretamente sobre neurônios sensoriais, mas exercem seus efeitos através da liberação de um hidroxíácido bioativo, o diidroxi-eicosatetraenoico (DiHETE), de leucócitos polimorfonucleares (LEVINE et al., 1986). Em tecidos inflamados, o LTD₄ produz uma rápida interação na expressão de genes em células como macrófagos e basófilos, que estimulam a síntese e liberação de eicosanóides (CROOK et al., 1989). Além disso, o LTD₄ parece ser capaz de induzir a liberação de substância P (BLOOMQUIST & KREAM, 1987), um neuropeptídeo abundante em nociceptores polinodais-C.

A bradicinina e a 5-hidroxitriptamina possuem uma dupla função no desenvolvimento da dor inflamatória. Ambas são capazes de ativar diretamente os nociceptores, assim como sensibilizá-los a outros estímulos (RANG et al., 1991; FERREIRA et al., 1993). A bradicinina ainda estimula a liberação de TNF-alfa e IL-1, a partir de macrófagos (TIFFANY & BURCH, 1989).

Duas vias diferentes foram identificadas na hiperalgisia. O TNF-alfa, liberado por estímulos inflamatórios, induz a liberação de IL-1 β e IL-6, que por sua vez estimulam a produção de produtos da cicloxigenase e, induz a liberação de IL-8, que estimula a produção de simpatomiméticos, como a dopamina, noradrenalina e adrenalina (CUNHA et al., 1992).

A inibição da síntese e liberação de TNF-alfa, parece ser um passo limitante no processo da hiperalgisia. Recentemente foi demonstrado, que a talidomida, um inibidor da síntese de TNF-alfa, é capaz de inibir a dor em alguns modelos de

nociceção, como o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético ou zimosan (VALE & RIBEIRO, 1996).

A associação da talidomida e FH, não foi capaz de modificar o efeito antinociceptivo da FH na nociceção induzida pelo ácido acético, demonstrando que nesse modelo seu efeito parece estar relacionado com a inibição da síntese de prostaglandinas ou simpatomiméticos e não com a síntese de TNF-alfa.

O teste da placa quente é bastante conhecido por ser sensível para drogas que agem a nível supra-espinhal (YASKSH & RUDY, 1977). Esse teste, assim como o “tail-flick” e o das contorções abdominais, são baseados em estímulos físicos de alta intensidade e suas respostas nociceptivas não são duradouras. Com o intuito de avaliarmos um possível efeito antinociceptivo da fração hidrossolúvel (FH) a nível de sistema nervoso central, utilizamos o teste da placa quente, onde observou-se que a FH não elevou o limiar de sensibilidade de camundongos ao estímulo térmico. A morfina, usada como controle positivo, apresentou nítido efeito analgésico em todos os períodos de tempo observados.

O teste da formalina é considerado um dos mais válidos modelos para se estudar dor clínica. Esse teste, diferente do que acontece na maioria dos modelos de dor, permite avaliar os mecanismos modulatórios envolvidos numa dor moderada e tônica gerada pela lesão tecidual (DUBUISSON & DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1981, 1982; ALREJA et al., 1984; TJOLSEN et al., 1992). Além disso, foi demonstrado que a dor periférica mediada pela injeção intraplantar de formalina, pode ser análoga a dor pós-operatória humana (ABBOTT & FRANKLIN, 1986).

Uma característica importante do teste da formalina em roedores, é que esses animais mostram uma resposta comportamental bifásica, que envolve mecanismos distintos (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987; COWAN et al., 1989). A primeira fase, caracterizada como uma dor neurogênica, representa provavelmente um efeito irritante direto da formalina sobre as fibras C sensoriais, enquanto a segunda fase, decorrente do desenvolvimento de um processo

inflamatório, envolve o recrutamento de células inflamatórias pelo neurônios aferentes primários adjacentes (HUNSKAAR et al., 1985; McCARSON & GOLDSTEIN, 1990).

Evidências experimentais indicam que a substância P e bradicinina participam da primeira fase do teste, enquanto a histamina, 5-hidroxitriptamina, prostaglandinas e bradicinina estão envolvidas na segunda fase (HALEY et al., 1989; SHIBATA et al., 1989; CORRÊA & CALIXTO, 1993). Além desses mediadores, foi demonstrado que aminoácidos excitatórios, como o L-glutamato e L-aspartato, também desempenham um papel no desenvolvimento da sensibilização central e nociceção persistente associadas à injeção de formalina (CODERRE & MELZACK, 1992).

Enquanto drogas de ação central, como os narcóticos, são capazes de inibir ambas as fases do teste da formalina, drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios não esteroidais e os corticosteróides, inibem apenas a segunda fase do teste (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

A FH, administrada por via oral ou intraperitoneal, e a FS II, administrada oralmente, foram capazes de antagonizar apenas a segunda fase da dor induzida pela administração da formalina em camundongos.

A atividade antinociceptiva da FH, parece não envolver a ativação de receptores opióides, visto que a naloxona, um conhecido antagonista opióide, não mostrou influência sobre a ação antinociceptiva da FH, mas foi capaz de abolir o efeito antinociceptivo da morfina. Foi demonstrado, que a atividade antinociceptiva periférica dos opiáceos pode ser mediada por um efeito direto sobre os eventos moleculares que controlam a hipersensibilidade nociceptora, através da ativação da adenilil ciclase, e não pelo bloqueio da sensibilização de nociceptores pelas prostaglandinas liberadas, como ocorre com os antiinflamatórios não esteroidais (FERREIRA & NAKAMURA, 1979). Entretanto, outros autores sugerem que a analgesia periférica dos opiáceos parece ser exercida através da formação de GMPC, via liberação de óxido nítrico (FERREIRA et al., 1991).

É difícil explicar o mecanismo preciso pelo qual a FH e a FS II causam antinocicepção em camundongos. Entretanto, os dados obtidos até agora evidenciam um efeito relacionado principalmente ao bloqueio da reação inflamatória.

Alguns autores têm sugerido, que o óxido nítrico desempenha um papel importante na sensibilização central e na persistência da nocicepção, seguida da injúria tecidual induzida pela formalina (MOORE et al., 1991; CODERRE & YASHPAL, 1994; SHIBUTA et al., 1996). Além disso, estudos feitos com cães e humanos, demonstraram que o óxido nítrico é também um mediador nociceptivo nestas espécies (PELLIGINO et al., 1996; KINDGEN-MILLES & ARNDT, 1996).

O óxido nítrico (NO) é uma substância gasosa, sintetizada a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular, que estimula a vasodilatação por ligar-se a guanilil ciclase solúvel, ativando a síntese de GMPc (MONCADA et al., 1991).

O NO é liberado a partir de células endoteliais vasculares *in vitro*, em resposta a uma grande variedade de substâncias como: bradicinina (PALMER et al., 1987), histamina (SAKUMA & LEVI, 1988) e 5-hidroxitriptamina (LUSCHER et al., 1990). O NO é também formado por macrófagos ativados por lipolissacarídeo (LPS) ou citocinas (AMBER et al., 1991). Adicionalmente, agentes flogogênicos como a carragenina e mediadores inflamatórios como o LTB₄, também induzem a síntese e liberação de NO a partir de leucócitos polimorfonucleares (RIMELE et al., 1988; McCALL et al., 1989; STURM et al., 1989).

A óxido nítrico sintase é a enzima responsável pela síntese de NO, e três isoformas dessa enzima já foram identificadas. Sabe-se que duas dessas são expressas constitutivamente e requerem cálcio para estimular a formação de NO, enquanto a terceira é induzível durante uma resposta inflamatória e sua indução é independente de cálcio (SCHULZ & TRIGGLE, 1994). Essa terceira enzima é expressa em macrófagos (LYONS et al., 1992), e parece ser responsável pela toxicidade e danos teciduais que têm sido atribuídos ao NO.

Atualmente, sabe-se que o NO não desempenha apenas um papel importante sobre a musculatura lisa vascular, mas também sobre o sistema nervoso central e periférico, assim como sobre o sistema imune (MONCADA et al., 1989).

Com base nessas evidências experimentais, passamos então a investigar o possível envolvimento do óxido nítrico na antinocicepção exercida pela fração hidrossolúvel (FH), assim como das FS I e II, no teste da formalina em camundongos. Primeiramente, mostramos que a L-arginina, nas doses utilizadas, reverte o efeito antinociceptivo do N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), um inibidor da geração de óxido nítrico, no teste da formalina. O L-NAME (18,7 e 37,5 mg/kg, i.p.), causou efeito inibitório significativo em ambas as fases do teste, apenas com a maior dose. A FH (1 mg/kg), administrada por via oral, também teve seu efeito revertido na segunda fase do teste, de forma dose-dependente pela L-arginina. Ainda utilizando o teste da formalina, o L-NAME (10 mg/kg), administrado por via intraperitoneal, teve seu efeito potencializado na segunda fase, quando associado à FH (0,5 e 1,0 mg/kg, v.o.), ou à FS I (0,5 mg/kg, v.o.) ou ainda à FS II (0,25 mg/kg, v.o.).

GOMES et al. (1996), sugerem que a cartilagem de tubarão pode ter um papel importante na prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio e lesões no DNA, por interagir com estas espécies. Seus resultados estão de acordo com aqueles apresentados por HARTMAN e SHANKEL (1990), que sugerem uma proteção de células contra mutagênese e lesões induzidas por peróxido de hidrogênio, na presença de cartilagem de tubarão. É possível que a inibição da síntese de óxido nítrico, pela FH e FS II, possa explicar seus efeitos antiinflamatórios e suas ações antinociceptivas.

É provável que proteínas presentes na FH e FS II, possam estar envolvidas em suas propriedades farmacológicas, visto que compostos, incluindo proteínas, presentes na cartilagem possuem atividade antiangiogênica comprovada (LEE & LANGER, 1983; OIKAWA et al., 1990), e podem ser absorvidos oralmente (WALKER et al., 1972, 1973; WARSHAW et al., 1974; GARDNER, 1988).

6 - CONCLUSÕES

Os estudos realizados com a cartilagem de tubarão, fração hidrossolúvel (FH), extraída da mesma, e frações semi-purificadas I e II (FS I e FS II), obtidas a partir da cromatografia da FH em coluna de gel de Sephadex G-100, nos permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

1- A cartilagem de tubarão, apesar de possuir baixa toxicidade para camundongos e ratos, promoveu alguns tipos de malformações a nível ocular, nos ratos provenientes de mães tratadas.

2- A fração hidrossolúvel (FH) da cartilagem de tubarão, assim como as frações semi-purificadas (FS I e FS II) obtidas da FH, possuem natureza proteica.

3- A FH demonstrou propriedade antiedematogênica sobre o edema de pata induzido tanto por carragenina como por dextrano.

4- O efeito inibitório da FH sobre o aumento da permeabilidade vascular cutânea induzido por histamina e 5-hidroxitriptamina, parece não envolver o bloqueio da síntese de TNF-alfa.

5- O bloqueio da migração de neutrófilos pela FH, parece envolver a inibição da síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, ou até mesmo uma possível inibição de uma das etapas envolvidas neste processo.

6- A atividade antiangiogênica da FH em ratos, pode estar relacionada à inibição de enzimas, como metaloproteinases e proteases, assim como, com a

inibição da migração e proliferação de células endoteliais, passos fundamentais no processo angiogênico.

7- O efeito antinociceptivo da FH, assim como da FS II parece estar relacionado à atividade antiinflamatória, visto que inibem apenas a nocicepção periférica.

8- O mecanismo de ação analgésica da FH provavelmente não envolve a participação de receptores opióides. Entretanto, o óxido nítrico parece desempenhar um papel importante na antinocicepção da FH e da FS II.

9- Os dados obtidos no presente trabalho, sugerem que a cartilagem de tubarão possui atividade analgésica, antiinflamatória e antiangiogênica. A fração ativa é hidrossolúvel e de natureza proteica.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B., LUDWICK, R. J. et al. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 15, p. 631-640, 1981.
- ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B. Noncompetitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 24, p. 319-321, 1986.
- ABBOTT, F. V., MELZACK, R., SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. **Exp Neurol.** v. 75, p. 644-651, 1982.
- ADKISSON, H. D., IV, RISENER, F. S., Jr., ZARRINKAR, P. P. et al. Unique fatty acid composition of normal cartilage: discovery of high levels of n-9 eicosatrienoic acid and low levels of n-6 polyunsaturated fatty acids. **FASEB J.** v. 5, p. 344-353, 1991.
- ALENCAR, J. W., PESSOA, J. C., CRAVEIRO, A. A. et al. Estudo químico preliminar da cartilagem de tubarões do Brasil. **Rev Bras Farm.** v. 76, p. 7-8, 1995.
- ALLISON, F., Jr., SMITH, M. R., WOOD, W. B. Studies NO the pathogenesis of acute inflammation. II. The actions of cortisone NO the inflammatory response to thermal injury. **J Exp Med.** v. 102, p. 669-679, 1955.

- ALREJA, M., MUTALIK, P., NAYAR, U. et al. The formalin test: a tonic pain model in the primate. **Pain**. v. 20, p. 97-105, 1984.
- AMBER, I. J., HIBBS, J. B., Jr., PARKER, C. J. et al. Activated macrophage conditioned medium: identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism. **J Leukoc Biol**. v. 49, p. 610-620, 1991.
- ANDREWS, P. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. **Methods Biochem Anal**. v. 18, p. 1-53, 1970.
- BEVILACQUA, M. P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu Rev Immunol**. v. 11, p. 767-804, 1993.
- BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M., MANNORI, G. et al. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu Rev Med**. v. 45, p. 361-378, 1994.
- BEVILACQUA, M. P., STENGALIN, S., GIMBRONE, M. A. et al. Endothelium leukocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**. v. 243, p. 1160-1165, 1989.
- BHATTACHERJEE, P., PATERSON, C. A. Further investigation into the ocular effects of prostaglandin E₂, leukotriene B₄ and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. **Exp. Eye Res**. v.51, p. 93-96, 1990.
- BLOOMQUIST, E. I., KREAM, R. M. Leukotriene D₄ acts in part to contract guinea pig ileum smooth muscle by releasing substance. **P J Pharmacol Exp Ther**. v. 240, p. 523-528, 1987.

- BLUNDEN, G. Biologically active compounds from marine organisms. In: EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed. Londres: W. B. Saunders, 1996. cap. 5, p. 18-27.
- BOMBARIERI, S., CATTANI, P., CIABATTO, G. et al The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis - differential effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Br J Pharmacol**. v. 73, p. 893-901, 1981.
- BROWN, R. A., TOMLINSON, I. W., HILL, C. R. et al. Relationship of angiogenesis factor in synovial fluid to various joint diseases. **Ann Rheum Dis**. v. 42, p. 301-307, 1983.
- BROWN, R. A., WEISS, J. B. Neovascularisation and its role in the osteoarthritic process. **Ann Rheum Dis**. v. 47, p. 881-885, 1988.
- BURCH, R. M., DE HAAS, C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 342, p. 189-193, 1990.
- CAPLAN, A. I. Cartilage. **Sci Amer**. v. 251, p. 84--94, 1984.
- CHERRY, P. D., FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. et al. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradecinin. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 79, p. 2106-2110, 1982.
- CODERRE, T. J., MELZACK, R. The contribution of excitatory aminoacids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**. v. 12, p. 3665-3670, 1992.

- CODERRE, T. J., YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur J Neurosci.** v. 6, p. 1328-1334, 1994.
- CORRÊA, C. R., CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol.** v. 110, p. 193-198, 1993.
- COWAN, A., PORRECA, F., WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluating analgesics. **NIDA Res Monogr.** v. 95, p. 116-122, 1989.
- CRONSTEIN, B. N., KIMMEL, S. C., LEVIN, R. I. et al. A mechanism for the inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 89, p. 9991-9995, 1992.
- CROOK, S. T., MATTERN, M., SARAU, H. M. et al. The signal transduction system of the leukotriene D₄ receptor. **Trends Pharmacol Sci.** v. 10, p. 103-107, 1989.
- CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur J Pharmacol.** v. 129, p. 65-76, 1986.
- CUNHA, F. Q., POOLE, S., LORENZETTI, B. B. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** v. 107, p. 660-664, 1992.

- CYBULSKY, M. I., McCOMB, D. J., MOVAT, H. Z. Protein synthesis dependent and independent mechanisms of neutrophil emigration. **Am J Pathol.** v. 135, p. 227-235, 1989.
- D'AMATO, R. J., LOUGHNAN, M. S., FLYNN, E. et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 91, p. 4082-4085, 1994.
- DAY, C. E., POWELL, J. R., LEVY, R. S. Sulfated polysaccharide inhibition of aortic uptake of low density lipoproteins. **Artery.** v. 1, p. 126-137, 1975.
- DERAET, R., JOUQUEY, S., BENZONI, J. et al. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Arch Int Pharmacodyn.** v., 224, p. 30-42, 1976.
- DERAET, R., JOUQUEY, S., DELEVALLÉE, F. et al. Release of prostaglandin E and F in algogenic reaction and its inhibition. **Eur J Pharmacol.** v. 61, p. 16-24, 1980.
- DI ROSA, M., GIROUD J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Path.** v. 104, p. 15-29, 1971.
- DUARTE, I. D. G., NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian J Med Biol Res.** v. 21, p. 341-343, 1988.
- DUBUISSON, D., DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** v. 4, p. 161-174, 1977.

- EDDY, N. B., LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 107, p. 385-393, 1953.
- FACCIOLI, L. H., SOUZA, G. E. P., CUNHA, F. Q. et al. Recombinant interleucin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. **Agents Actions.** v. 30, p. 344-349, 1990.
- FAN, T-P. D., JAGGAR, R., BICKNELL, R. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. **Trends Pharmacol Sci.** v. 16, p. 57-66, 1995.
- FANTUZZI, G., GHEZZI, P. Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammatory disease. **Mediat Inflamm.** v. 2, p. 263-267, 1993.
- FERREIRA, S. H., DUARTE, I. D. G., LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur J Pharmacol.** v. 201, p. 121-122, 1991.
- FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** v. 110, p. 1227-1231, 1993.
- FERREIRA, S. H., NAKAMURA, M. II - Prostaglandin hyperalgesia, the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalin and opioid antagonist. **Prostaglandins.** v. 18, p. 191-200, 1979.
- FISCHBACH, F. T. **Quick reference to common laboratory and diagnostic tests.** Filadelfia: J. B. Lippincott Company. 1995. p. 192, 204, 206.

- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med.** v. 285, p. 1182-1186, 1971.
- FOLKMAN, J., COLE, P., ZIMMERMAN, S. Tumor behavior in isolated perfused organs: *In vitro* growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. **Ann Surg.** v. 164, p. 491-501, 1966.
- FOLKMAN, J., KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science.** v. 235, p. 442-447, 1987.
- FOLKMAN, J., LONG, D. M., BECKER, F. F. Growth and metastasis of tumor in organ culture. **Cancer.** v. 16, p. 453-467, 1963.
- FOLKMAN, J., MERLER, E., ABERNATHY, C. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **J Exp Med.** v. 133, p.275-288, 1971.
- FORSYTH, K. D., TALBOLT, V. Role of glucocorticoids in neutrophil and endothelial adhesion molecule expression and function. **Mediat Inflamm.** v. 1, p. 101-106, 1992.
- FORTES, Z. B., OLIVEIRA, M. A., SCIVOLETTO, R. et al. Nitric oxide release may be involved in the microcirculatory response to acetylcholine. **Eur J Pharmacol.** v. 182, p. 143-147, 1990.
- FRATER-SCHRODER, M., RISAU, W., HOLLMAN, R. et al. Tumor necrosis factor type α , a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 84, p. 5277-5281, 1987.
- FURCHGOTT, R. F., VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.** v. 3, p. 2007-2018, 1989.

- FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288, p. 373-376, 1980.
- GARDNER, M. L. G. Gastrointestinal absorption of intact proteins. **Ann Rev Nutr**. v. 8, p. 329-350, 1988.
- GAW, A., COWAN, R. A., O'REILLY, D. ST. J. et al. **Clinical biochemistry**. Londres: Churchill Livingstone. 1995. p. 7, 27, 45, 51, 70.
- GIMBRONE, M. A. Jr., ASTER, R. H., COTRAN, R. S. et al. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. **Nature**. v. 223, p. 33, 1969.
- GOMES, E. M., SOUTO, P. R. F., FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. **Mutation Res**. v. 367, p. 203-208, 1996.
- GSCHWENDT, M., FURSTENBERGER, G., ROSE-JOHN, S. et al. Bryostatin 1, an activator of protein kinase C, mimics as well as inhibits biological effects of the phorbol ester TPA *in vivo* and *in vitro*. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 555-562, 1988.
- GYIRES, K., KNOLL, J. Inflammation and writhing syndrome inducing effect of PGE₁, PGE₂ and the inhibition of these actions. **Pol J Pharmacol Pharm**. v. 27, p. 257-264, 1975.
- GYIRES, K., TORMA, Z. The use of the writhing test in mice for screening different types of analgesics. **Arch Int Pharmacodyn**. v. 267, p. 131-140, 1984.

- HALEY, J. E., DICKENSON, A. H., SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of bradykinin in chemical nociception in the rat. **Neurosci Lett.** v. 97, p. 198-202, 1989.
- HARTMAN, P. E., SHANKEL, D. Antimutagenesis and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environ Mol Mutagen.** V.15, p. 145-182, 1990.
- HENNINGS, H., BLUMBERG, P.M., PETTIT, G.R. et al. Bryostatin 1, an activator of protein kinase C, inhibits tumor promotion by phorbol esters in SENCAR mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1343-1346, 1987.
- HESS, A. D., SILANSKIS, M. K., ESA, A. H. et al. Activation of human T lymphocytes by bryostatin. **J. Immunol.**, v. 141, p. 3263-3269, 1988.
- HOLDEN, C. Antecedents of mammalian immunity. **Science**, v. 265, p. 2006, 1994.
- HOOK, M., KJELLEN, L., JOHANSSON, S. et al. Cell-surface glycosaminoglycans. **Ann Rev Biochem.** v. 53, p. 847-869, 1984.
- HOUCK, J. C., VICKERS, K. Inhibition of inflammation and acceleration of tissue repair by cartilage powder. **Surgery.** v. 51, p. 632-638, 1962.
- HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Meth.** v. 14, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** v. 30, p. 103-114, 1987.

- IALENTI, A., IANARO, A., MONCADA, S. et al. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur J Pharmacol.** v. 211, p. 177- 182, 1992.
- IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. **FASEB J.** v. 3, p. 31-36, 1989.
- JANISZEWSKI, L. The action of toxins on the voltage-gated sodium channel. **Pol J Pharmacol Pharm.** v. 42, p. 581-588, 1990.
- KATORI, M., ODA, T., NAGAI, K. A site of action for dexamethasone NO leukocyte extravasation in the microcirculation. **Agents Actions.** v. 29, p. 24-26, 1990.
- KIMURA, M., SUZUKI, J., AMEMIYA, K. Mouse granuloma pouch induced by Freund's complete adjuvant with croton oil. **J Pharmacobio-Dyn.** v. 8, p. 393-400, 1985.
- KINDGEN-MILLES, D., ARNDT, J. O. Nitric oxide as a chemical link in the generation of pain from veins in humans. **Pain.** v. 64, p. 139-142, 1996.
- KOSTER, R., ANDERSON, M., DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc.** v. 18, p. 412-417, 1959.
- KREGBER, L. No local alterations of the blood-vessels of tar painted mice. **Br J Exp Pathol.** v. 8, p. 465-476, 1927.
- KUEHL, F. A., Jr., EGAN, R. W. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. **Science.** v. 210, p. 978-984, 1980.

- LANE, I. W., COMAC, L. **Sharks don't get cancer**. Nova Iorque: Avery Publishing Group Inc., 1993. 193 p.
- LANGER, R., BREM, H., FALTERMAN, K. et al. Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. **Science**. v. 193, p. 70-72, 1976.
- LATTES, R., MARTIN, J. R., MEYER, K. et al. Effect of cartilage and other tissue suspensions on reparative processes of cortisone-treated animals. **Am J Path**. v. 32, p. 979, 1956.
- LEE, A., LANGER, R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. **Science**. v. 221, p. 1185-1187, 1983.
- LEIBOVICH, S. J., POLVERINI, P. J., SHEPARD, H. M. et al. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor α . **Nature**. v. 329, p. 630-632, 1987.
- LEVINE, J. D., LAM, D., TAIWO, Y. O. et al. Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 83, p. 5331-5334, 1986.
- LIMA, A. O., SOARES, J. B., GRECO, J. B. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: Técnica e interpretação**. Hematologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1985. p. 406-533.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., LEWIS FARR, A., RANDALL, J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v. 193, p. 265-275, 1951.

- LO, T. N., ALMEIDA, A. P., BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indometacin. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 221, p. 261-267, 1982.
- LUSCHER, T. F., RICHARD, V., TSCHUDI, M. et al. Serotonin and the endothelium. **Clin Physiol Biochem.** v. 8, p. 108-119, 1990.
- LUSCINSKAS, F. W., CYBULSKY, M. I., KIELY, J. M. et al. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. **J Immunol.** v. 146, p. 1617-1625, 1991.
- LYONS, C. R., ORLOFF, G. J., CUNNINGHAM, J. M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **J Biol Chem.** v. 267, p. 6370-6374, 1992.
- MACKAY, C. R., IMHOF, B. A. Cell adhesion in the immune system. **Immunol Today.** v. 14, p. 99-102, 1993.
- MACKAY, A. R., SEDGWICK, A. D., DUNN, C. J. et al. The transition from acute to chronic inflammation. **Br J Dermatol.** v.113, p.34-48, 1985.
- MANCUSO, F., FLOWER, R. J., PERRETTI, M. Leukocyte transmigration, but not rolling or adhesion, is selectively inhibited by dexamethasone in the hamster post-capillary venule. Involvement of endogenous lipocortin 1. **J Immunol.** v, 155, p. 377-386, 1995.

- MANDELL, G. L., PETRI, W. A., Jr. Antimicrobial agents: Penicilins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. In: GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G., HARDMAN, J. G. et al. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 9 ed. U.S.A.: The McGraw-Hill Companies Inc., 1996. Cap. 45, p.1089.
- MASSO, J. M., VILLAR, A., M., CONDE, J. R., MARTORELL, J. Effects of fepradinol on rat acute models of vascular permeability and leucocyte migration. **Agents Actions**. v. 42, p. 118-122, 1994.
- MATSUSHIMA, T., NAKASHIMA, Y., SUGANO, M. et al. Suppression of atherogenesis in hypercholesterolemic rabbits by chondroitin-6-sulfate. **Artery**. v. 14, p. 316-337, 1987.
- MAY, W. S., SHARKIS, S. J., ESA, A. H. et al. Antineoplastic bryostatins are multipotential stimulators of human hematopoietic progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 84, p. 8483-8487, 1987.
- MAYHAN, W. G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**. v. 16, p. 295-305, 1992.
- McCALL, T. B., BOUGHTON-SMITH, N. K., PALMER, R. M. J. et al. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anions. **Biochem J**. v. 261, p. 293-296, 1989.
- McCARSON, K. E., GOLDSTEIN, B. D. Time course of the alteration in dorsal horn substance P levels following formalin: blockade by naloxone. **Pain**. v. 41, p. 95-100, 1990.

- MICHAELSON, I. C. The model of development of the vascular system of the retina, with some observations on its significance for certain retinal diseases. **Trans Ophthalmol Soc U. K.** v. 68, p. 137-180, 1948.
- MICHEL, N. WHORTON, C. M. Delay of the early inflammatory response by cortisone. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 76, p. 754-757, 1951.
- MONCADA, S., FERREIRA, S. H., VANE, J. R. Pain and inflammation mediators. In: VANE, J. R., FERREIRA, S. H. **Inflammation.** Berlin: Springer Verlag Heidelberg, 1978. p. 588-616.
- MONCADA, S., HERMAN, A. G., VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing factor identified as nitric oxide. **Trends Pharmacol Sci.** v. 8, p. 365-368, 1987.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol.** v. 38, p. 1709-1715, 1989.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v. 43, p. 109-142, 1991.
- MOON, V. H., TERSHAKOVIC, G. A. Influence of cortisone upon acute inflammation. **Proc Soc Exp Biol Med U.S.A.** v. 79, p. 63-69, 1953.
- MOORE, P. K., OLUYOMI, A. O., BABBEDGE, R. C. et al. L-N^G-nitro-arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol.** v. 102, p. 198-202, 1991.

- MOREIRA, A. L., SAMPAIO, E. P., ZMUIDZINAS, A. et al. Thalidomide exerts its inhibitory action NO tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med.** v. 177, p. 1675-1680, 1993.
- MORRISON, L. M., MURATA, K., QUILLIGAN, J. J. et al. Prevention of atherosclerosis in subhuman primates by chondroitin sulfate A. **Circ Res.** v. 19, p. 358-363, 1966.
- MORRISON, L. M. Reducing of ischemic coronary heart disease by chondroitin sulfate A. **Angiology.** v. 22, p. 165-174, 1971.
- MOSES, M. A., SUDHALTER, J., LANGER, R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. **Science.** v. 248, p. 1408-1410, 1990.
- MOSS, M. L. Skeletal tissues in sharks. **Amer Zool.**, v. 17, p. 335-342, 1977.
- NORTHOVER, B. J. The permeability of plasma proteins of the peritoneal blood vessels of the mouse, and the effect of substances that alter permeability. **J Path Bacter.** v. 85, p. 361-370, 1963.
- ODA, T., KATORI, M. Inhibition site of dexamethasone NO extravasation of polymorphonuclear leukocytes in the hamster cheek pouch microcirculation. **J Leukocyte Biol.** v. 52, p. 1337-1342, 1992.
- OIKAWA, T., ASHINO-FUSE, H., SHIMAMURA, M. et al. A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. **Cancer Lett.** v. 51, p. 181-186, 1990.

- ONODERA, S., KUBOKI, Y., TASHIRO, S. Purification of a noncollagenous high molecular weight protein from bovine articular cartilage. **Biol & Pharm Bull**, v. 19, p. 11-17, 1996.
- OSBORNE, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell**. v. 62, p. 3-6, 1990.
- OTTERNESS, I. G., GANS, D. J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: An analysis of the relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling. **J Pharm Sci**. v. 77, p. 790-795, 1988.
- PALMER, R. M., FERRIGE, A. G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, p. 524-526, 1987.
- PARKER, J., WAITE, M., PETTIT, G. R. et al. Stimulation of arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by bryostatin 1. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 1471-1474, 1988
- PARRAT, J. R., WEST, G. B. Isolation by various substances of oedema formation in the hind paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg white and compound 48/80. **Br J Pharmac Chemother**. v. 33, p. 501-512, 1972.
- PAULETTE, R. E., PRUDDEN, J. F. Studies NO acceleration of wound healing with cartilage: II. Histologic observations. **Surg Gynec Obstet**. v. 108, p. 408-410, 1959.

- PELLIGRINO, D. A., LAURITO, C. E., VADEBONCOUER, T. R. Nitric oxide synthase inhibition modulates the ventilatory depressant and antinociceptive actions of fourth ventricular infusions of morphine in the awake dog. **Anesthesiology**. v. 85, p. 1367-1377, 1996.
- PETTIBONE, D. J., MULLER, G. P. Alpha adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. **Endocrinology**. v. 109, p. 798-802, 1989.
- POHL, U., HOLTZ, J., BUSSE, R. et al. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow *in vivo*. **Hypertension**. v. 8, p. 37-44, 1986.
- PRUDDEN, J. F. Stimulation of wound healing with heterologous cartilage. **Transplant Bull**. v. 5, p. 14, 1958.
- PRUDDEN, J. F. The treatment of human cancer with agents derived from bovine cartilage. **J Biol Resp Modif**. v. 4, p. 551-584, 1985.
- PRUDDEN, J. F., ALLEN, J. The clinical acceleration of healing with a cartilage preparation. **JAMA**. v. 192, p. 352-356, 1965.
- PRUDDEN, J. F., BALASSA, L. L. The biological activity of bovine cartilage preparations. Clinical demonstration of their potent anti-inflammatory capacity with supplementary notes NO certain relevant fundamental supportive studies. **Semin Arthritis Rheum**. v. 3, p. 287-321, 1974.
- PRUDDEN, J. F., NISHIHARA, G., BAKER, L. Acceleration of wound healing with cartilage-I. **Surg Gynec Obstet**. v. 105, p. 283-286, 1957.

- RANG, H. P., BEVAN, S., DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **British Medical Bulletin**. v. 47, p. 534-548, 1991.
- RAUIS, J. Use of shark cartilage in the treatment of secondary osteoarthritis in the dog. In: British Small Animals Association Congress, 1991, United Kingdom. **Anais...** United Kingdom, 1991.
- RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A., CUNHA, F. Q. et al. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**. v. 73, p. 472-477, 1991.
- RIBEIRO, R. A., SOUZA-FILHO, M. V., SOUZA, M. H. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int Arch Allergy Immunol**. v. 112, p. 27-35, 1997.
- RIMELE, T. J., STURM, R. J., ADAMS, L. M. et al. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of neutrophil-derived relaxin factor. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 245, p. 102-111, 1988.
- ROUGHLEY, P. J., MURPHY, G., BARRET, A. J. Proteinase inhibitors of bovine nasal cartilage. **Biochem J**. v. 169, p. 721-724, 1978.
- RUBANYI, G. M., ROMERO, J. C., VANHOUTTE, P. M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**. v. 250, p. H1145-1149, 1986.
- SAKUMA, I., LEVI, R. Vasomotor effects of leukotrienes C₄ and D₄ on canine pulmonary artery and aorta. Characterization and mechanisms. **Ann N Y Acad Sci**. V. 524, p. 91-102, 1988.

- SAMPAIO, E. P., MOREIRA, A. L., SARNO, E. N. et al. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. **J Exp Med.** v. 175, p. 1729-1737, 1992.
- SAMPAIO, E. P., KAPLAN, G., MIRANDA, A. et al. The influence of thalidomide NO the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J Infect Dis.** v. 168, p. 408-414, 1993.
- SARIN, P.S., SUN, D., THORTON, A. et al. Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. **J Natl Cancer Inst.** v. 78, p. 663-666, 1987.
- SAUTEBIN, L., IALENTI, A., IANARO, A. et al. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema. **Eur J Pharmacol.** v. 286, p. 219-222, 1995.
- SCHREINER, G. F., FLYE, W., BRUNT, E. et al. Essential fatty acid depletion of renal allografts and prevention of rejection. **Science.** v. 240, p. 1032-1033, 1988.
- SCHULZ, R., TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends Pharmacol Sci.** v. 15, p. 255-259, 1994.
- SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI, H. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain.** v. 38, p. 347-352, 1989.
- SHIBUTA, S., MASHIMO, T., ZHANG, P. et al. A new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits a nociceptive effect in the rat formalin model. **J Neurol Sci.** v. 141, p. 1-5, 1996.

- SMITH, C. W., KISHIMOTO, T. K., ABBASS, O. et al. Chemotactic factors regulated lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells *in vitro*. **J Clin Invest.** v. 87, p. 609-618, 1991.
- SMITH, C. W., ROTHLEIN, R., HUGHES, B. J. et al. Recognition of an endothelium determinant for CD18-dependent neutrophil adherence and transendothelial migration. **J Clin Invest.** v. 82, p. 1746-1756, 1988.
- SOUZA, G. E. P., FERREIRA, S. H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.** v. 17, p. 97-103, 1985.
- STIRLING, D. I. Thalidomide: A pharmaceutical enigma. **Pharm News.** v. 3, p. 17-20, 1996.
- STRYER, L. Proteínas do tecido conjuntivo. In: _____. **Bioquímica.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 11, p. 213-229.
- STURM, R. J., HOLLOWAY, D. A., BUCKLEY, S. et al. Potential regulatory role of inflammatory cells on local vascular smooth muscle tone. **Agents Actions.** v. 27, p. 414-417, 1989.
- SUSSKIND, H., BECKER, W. Random packing of spheres in non-rigid containers. **Nature.** v. 212, p. 1564-1565, 1966.
- TAKAHASHI, R. N., PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian J Med Biol Res.** v. 20, p. 607-610, 1987.

- TIFFANY, C. W., BURCH, R. M. Bradykinin stimulates tumour necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. **FEBS Lett.** v. 247, p. 189-192, 1989.
- THIESSEN, N. W. The vascularity of benign and malignant lesions of the stomach. **Surg Gynecol Obstet.** v. 63, p. 149-156, 1936.
- TJOLSEN, A., BERGE, O.-G., HUNSKAAR, S. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** v. 51, p. 5-17, 1992.
- VALE, M. L., RIBEIRO, R. A. Efeito analgésico da talidomida em modelos experimentais. In: ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 15, 1996, Fortaleza. **Programa e Resumos...** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1996.
- VANDER, W. C., MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc.** v. 15, p. 494, 1956.
- VANHOUTTE, P. M. Vascular physiology: the end of the quest?. **Nature.** v. 327, p. 459-460, 1987.
- WALKER, M. Why shark cartilage should succeed against cancer and other pathologies. **Townsend Letter for Doctors**, Medicinal Journalist Report of Inovative Biologics, November, p. 847-854, 1991.
- WALKER, W. A., ISSELBACHER, K. J., BLOCH, K. J. Intestinal uptake of macromolecules: effect of oral immunization. **Science.** v. 177, p. 608-610, 1972.
- WALKER, W. A., ISSELBACHER, K. J., BLOCH, K. J. Intestinal uptake of macromolecules: II. Effect of parenteral immunization. **J Immunol.** v. 111, p. 221-226, 1973.

- WARSHAW, A. L., WALKER, W. A., ISSELBACHER, K. J. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. **Gastroenterology**. v. 66, p. 987-992, 1974.
- WEDMORE, C. V., WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leucocytes in inflammation. **Nature**. v. 289, p. 646-650, 1981.
- WEISS, J. B., BROWN, R. A., KUMAR, S. et al. An angiogenic factor isolated from tumours: a potent low molecular weight compound. **Br J Cancer**. v., 40, p. 493-496, 1979.
- WEISS, J. B., HILL, C. R., DAVIS, R. J. et al. Activation of procollagenase by low molecular weight angiogenesis factor. **Biosci Rep**. v. 3, p. 171-177, 1983.
- WHALEY, K., FERGUSON, A. Molecular aspects of complement activation. **Mol Aspects Med**. v. 4, p. 209-273, 1981.
- WILLIAMS, T. J., MORLEY, J. Prostaglandin as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**. v. 246, p. 215-217, 1973.
- WILLIAMS, T. J., PECK, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**. v. 270, p. 530-532, 1977.
- WILLIS, A. L. Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion. **J Pharm Pharmacol**. v. 21, p. 126-128, 1969a.

- WILLIS, A. L. Release of histamine, kinin and prostaglandin during carrageenan-induced inflammation in the rat. Mantegazza, P., Horton, E. W. In: **Prostaglandins, peptides and amines**. Londres and Nova Iorque, 1969b. p. 31.
- WINTER, C.A., RISELY, E. A., NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 111, p. 544-547, 1962.
- YASKSH, T. I., RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 202, p. 411-428, 1977.
- YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripelemamine in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 235, p. 683-688, 1986.
- ZIMMERMAN, G. A., PRESCOTT, S. M., McINTYRE, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol Today.** v, 13, p. 93-100, 1992.