



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

200331910

PETRA KARLA BÖCKELMANN

ESTUDO DO EFEITO DO NAPROXENO NA  
REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL DO PEIXE  
TELEÓSTEO *Cyprinus carpio* (carpa)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Petra Karla Böckelmann Ivanira José Bechara e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ivanira José Bechara



UNIDADE	U B
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	B631e
V	EX
TOMBO BCI	56036
PROC.	16.124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/10/03
Nº CPD	

CM00190420-3

Bibia 302166

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Böckelmann, Petra Karla

**B631e**

Estudo do efeito do naproxeno na regeneração da nadadeira caudal do peixe teleósteo *Cyprinus carpio* (carpa) / Petra Karla Böckelmann. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

**Orientadora: Ivanira José Bechara**

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

**Instituto de Biologia.**

1. Regeneração (Biologia). 2. Colageno. 3. Teleosteos. I. Bechara, Ivanira Jose.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

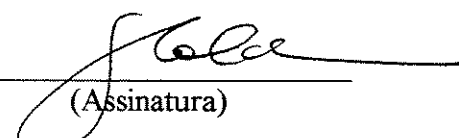
Data da Defesa: 18/08/2003

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Ivanira José Bechara (Orientadora)

  
(Assinatura)

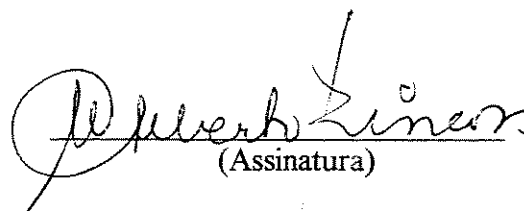
Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini

  
(Assinatura)

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon

  
(Assinatura)



## AGRADECIMENTOS

*São tantas as pessoas e os bichinhos que tenho para agradecer, que tenho medo de esquecer alguém.*

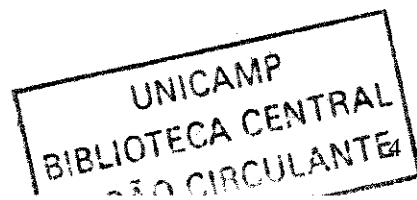
*As pessoas entram e saem de nossas vidas com uma velocidade incrível e só nos deixam a lembrança e a saudade. Alguns ainda estão entre nós, mas outros já se foram, tornando impossível acabar com a nossa saudade. Mas ainda bem que pelo menos essas pessoas entraram em nossas vidas e nos tornaram melhores. São essas pessoas que agradeço, e muito.*

*Os amigos, a minha família e meus bichinhos são como o céu.*

*Meus amigos são as estrelas que iluminam o céu do meu coração. Algumas estrelas com o decorrer do tempo se apagam, mas eu sei que continuam no seu lugar, apenas apagadas ou com uma luz bem fraquinha, outras, estão no auge de sua luz, iluminando tudo e todos, mas eu sei que um dia elas também irão se apagar, mas continuarão ali, guardadinhas em meu coração.*

*Assim, agradeço agora, neste instante, as minhas estrelinhas de plantão. Agradeço a você, Elisa, a primeira de minha lista, a minha estrelinha que tem uma luz extremamente forte em todos os momentos, desde aqueles em que você está meio perdida até aqueles em que seu sorriso faz as coisas mais difíceis parecerem as mais fáceis, muito obrigada!!*

*Agradeço a minha outra estrelinha, aquela de luz exuberante, a da minha amiga Ângela que me acompanhou desde o início deste trabalho e sempre me ajudou, tanto nos*



*momentos felizes, como naqueles em que nada dá certo e se não fossem as palavras de ânimo desta minha estrelinha tudo seria muito mais difícil.*

*Agradeço a minha estrelinha meiga, você, Fabíola, por tudo de bom e por tudo de melhor ainda. Agradeço a Márcia, a Suzana, a Débora, a Carol, as Lucianas, a Pulga, a Silvane, a Eliane, a Camila, a Gabi, a Dani bananinha, ao Leo e ao Gustavo, minhas estrelas radiantes.*

*Agradeço até o Júnior, aquela estrelinha saltitante e extremamente importante.*

*Agradeço o meu amigo André (Angola), a minha estrela com luz própria.*

*Agradeço as estrelinhas, que são anjinhos da guarda também: Dona Raquel, que sempre iluminou meu caminho com aquele sorriso de menina, a Cleusa, que também faz milagres com a sua risada, a Marta Almeida, a Marta Leonardo, o Baltazar, a Rita e a Bia, minhas estrelas guia.*

*Agradeço as minhas estrelinhas da Microscopia Eletrônica que me ajudaram tanto. Agradeço as estrelas do Departamento de Histologia, ou seja, todos os professores pelas ajudas e pelos momentos válidos.*

*Agradeço em especial, o Professor Luís, que após participar da sua disciplina “Biologia do Desenvolvimento”, minhas idéias de muitas coisas, tanto profissional como pessoal evoluíram muito, agora sei analisar muito bem o que é bom ou não para minha vida. Obrigada!*

*Agradeço o Professor Paulo pela paciência em me explicar tantas vezes como tirar fotos no microscópio. Obrigada também.*

*E agradeço a minha estrela mais importante de todo meu trabalho de Mestrado, minha orientadora, Ivanira José Bechara. Muito obrigada, Ivanira, por sempre me orientar com dedicação, respeito e carinho, características raras nos dias de hoje.*

*Como disse, meus amigos são as estrelas que iluminam o meu céu. A minha família é o meu sol, aquele que me aquece em todos os momentos de minha vida e que a sua luz jamais se apagará.*

*Minha família, como poderei descrever aqui o que é minha família para mim, é meu porto seguro, é tudo que existe no mundo de bom.*

*Minhas irmãs, Maria Alice e Marianne são as melhores irmãs, amigas e companheiras que Ele lá em cima poderia me dar. Meu pai do jeitinho dele também é um grande amigo, mas do jeito dele, é claro! Amo todos vocês!*

*Meu companheiro, porque namorado ele já é, tem o dom de me fazer descer ao chão quando estou voando demais. Obrigada, Pita e saiba que sou uma pessoa com muita sorte, pois há pessoas no mundo que levam a vida inteira para encontrar um companheiro como você e eu, na primeira já encontrei. Te Amo!*

*Minha mãe, a pessoa mais importante da minha vida, como amo você, mãe! Amo tanto que chega a não ter mais espaço em meu coração. Se, em algum momento da sua vida, você teve ou terá alguma dúvida do que você nos ensinou, se achar que falhou em algo, esqueça, mãe, você não errou em nada, só acertou. Muito obrigada pela vida e pelos valores que você me concedeu. Tenho orgulho de ser sua filha. Te amo!!!!*

*E, como meus amigos são as estrelas, minha família o meu sol, meus bichinhos são como a lua, estarão sempre lá, quietinhos, sem chamar a atenção até que alguém chegue, aí sim, é uma bagunça.*

*Algumas pessoas podem achar besteira do valor que dou aos meus bichinhos, mas não me importo, amo cada um deles. Na verdade, eles não são meus, eu é que sou deles. E agradeço a todos eles, ao Black, meu lindão, a Tika, minha dama, a Tetê, minha matraca de plantão, a Lulis, que não late, mia, a Totsie, que não para um segundo, a Brida, a Carlota e aqueles que já se foram e que sinto tanta falta, Sabrina, Manchinha, Sigfrida e Panakão. Amo todos eles.*

*E por último e não menos importante, agradeço aos peixinhos que tiveram suas vidas sacrificadas para que esse trabalho fosse feito. Às vezes me pergunto: Será que temos direito?*

**MUITO OBRIGADA, PELO MEU CÉU ESTRELADO, PELO CALOR QUE  
ME AQUECE E PELA LUA QUE ME ACALMA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!**

## ABSTRACT

The fins of teleosts show a very fast capacity for regeneration, what make them one important and appropriate biologic model for study of the drugs that can affect their development. The rays of fins are formed, for the most part, of collagen and glycosaminoglycans and, as showed on literature reports, some antiinflammatory drugs, steroidal and nonsteroidal, may affect the extracellular matrix composition of connective tissue. In the present investigation we studied the effect of naproxen, a non-steroidal anti-inflammatory drug used for the treatment of rheumatic disease, during the regeneration process of the tail fin of the teleost fish *Cyprinus carpio* (carp). The beginning of the experiment was conducted using 2 aquaria containing 6 liters of water each were set up. The water was clear and dechlorinated, the temperature was kept at 24°C and under constant aeration. The naproxen was dissolved in one of them to obtain the dose of 10.4 mg/L, while the other contained only water and was used as a control. Forty-two alevins were anesthetized with benzocaine (1:10000) and their tail fins were transversely amputated. After amputation, the fishes were divided into 2 groups of 21 animals each. One group was placed in the aquarium containing the drug and the other was placed in the control aquarium. The fishes were left in the aquaria until the occurrence of regeneration. Half of the water in each aquarium was exchanged daily with clean water until the end of the experiment and half of the dose of naproxen, 5.2 mg/L, was added to the experimental aquarium in order to restaured the initial concentration.

The animals were anesthetized and sacrificed and the regenerating fins were excised and fixed at intervals of 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days after amputation. Three specimens per



time point were used. The collected samples were processed for standard and polarized light microscopy and for transmission electron microscopy.

In general, naproxen at the dose used in the present study did not affect the organization of the extracellular matrix components and the mineralization of the fundamental substance of the lepidotrichia during the process of tail fin regeneration. Since the effect of naproxen, as well as of other non-steroidal anti-inflammatory drugs, depends on the dose used, the route of administration and the metabolism of the animal in which the drug is being tested, higher doses of the drug may perhaps delay or even fully inhibit this process, possibly also provoke disorganization of the lepidotrichial matrix.

## RESUMO

As nadadeiras dos peixes teleósteos apresentam uma capacidade de regeneração bastante rápida, o que as torna um modelo biológico importante e adequado para o estudo do efeito de drogas que possam alterar esse crescimento. Os raios que constituem as nadadeiras são constituídos, em grande parte, por colágeno e glicosaminoglicanos e, sabe-se, por relatos na literatura, que certas drogas anti-inflamatórias, esteróides e não esteróides, podem afetar a composição da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos. Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito do naproxeno, uma droga anti-inflamatória não esteróide utilizada no tratamento de doenças reumáticas, durante o processo regenerativo da nadadeira caudal do peixe teleósteo *Cyprinus carpio*. Para isso, 2 aquários com 6 litros de água cada um foram montados. A água foi dechlorada e limpa, a temperatura foi de 24°C e a aeração foi constante. Em um dos aquários foi dissolvido o naproxeno na dose 10,4mg/L. O outro aquário, contendo apenas água, serviu como controle. Quarenta e dois alevinos foram anestesiados com benzocaína (1:10000) e tiveram suas nadadeiras caudais amputadas transversalmente. Após a amputação, os peixes foram divididos em 2 grupos de 21 peixes cada. Um grupo foi para o aquário contendo o naproxeno dissolvido e o outro grupo foi para o aquário controle. Os peixes permaneceram nestes aquários até que a regeneração ocorresse. Diariamente, até o final do experimento, metade da água de cada aquário foi trocada por água limpa e, no aquário experimental, metade da dose de naproxeno, 5,2 mg/L, foi acrescentada.

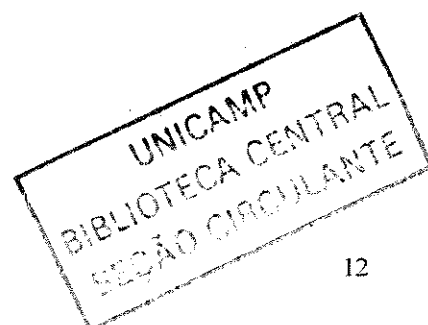
Os animais foram anestesiados, sacrificados e as nadadeiras em regeneração foram excisadas e fixadas em intervalos de 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias após a amputação. Foram

utilizados 3 espécimes, por grupo, para cada intervalo de tempo. As amostras foram processadas para permitir estudos através da microscopia de luz convencional e polarizada e através da microscopia eletrônica de transmissão.

No geral, o naproxeno, na dose utilizada neste trabalho, não afetou a organização dos componentes da matriz extracelular e nem a mineralização da substância fundamental da lepidotriquia durante o processo regenerativo da nadadeira caudal. Como o efeito do naproxeno, bem como de outras drogas anti-inflamatórias não esteróides, depende da dose utilizada, da via de administração e do metabolismo do animal em que a droga está sendo testada, talvez doses maiores da droga possam provocar um atraso ou até inibir por completo esse processo de regeneração, podendo, também, provocar uma desorganização da matriz lepidotriquial.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
• <b>O peixe como modelo biológico</b>	<b>13</b>
• <b>A carpa</b>	<b>14</b>
• <b>A estrutura da nadadeira dos peixes teleósteos</b>	<b>15</b>
• <b>A regeneração das nadadeiras dos teleósteos</b>	<b>18</b>
• <b>Fatores que influenciam a taxa de regeneração</b>	<b>24</b>
• <b>O naproxeno</b>	<b>25</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>ARTIGO SUBMETIDO</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>



## INTRODUÇÃO

### 1. O peixe como modelo biológico

Os peixes têm sido freqüentemente utilizados como modelo biológico, não somente para o acompanhamento ambiental da poluição aquática, mas como um grupo alternativo de vertebrados para estudos comparativos e detalhados do mecanismo de ação de carcinógenos e outras substâncias (Dawe, 1982; Bailey et al., 1984).

Estes animais oferecem algumas vantagens como modelo biológico, por exemplo:

- a) Apresentam grande número de descendentes a partir de uma mesma desova;
- b) Possibilitam a obtenção de um grande número de exemplares aparentados e a baixo custo, permitindo assim ampliar a amostragem;
- c) A dieta pode ser cuidadosamente controlada assim que começam a aceitar ração;
- d) Várias vias de administração química podem ser empregadas, como pelo acréscimo à ração, por injeções, ou pela adição à própria água do tanque;
- e) A rápida velocidade de regeneração apresentada pelas nadadeiras torna essas estruturas um modelo biológico bom para o estudo *in vivo* do crescimento dos tecidos conjuntivos e, também, para o estudo do efeito de substâncias que possam, por ventura, interferir com esse processo regenerativo.

Em certos tipos de estudo, os peixes têm oferecido vantagens sobre os roedores, o tradicional modelo biológico, como por exemplo: viabilidade de obtenção de clones genéticos totalmente homozigóticos (Streisinger et al., 1981), a utilização de embriões como modelo, o que permite testar em alta escala diminutas quantidades de substâncias

químicas (Hendricks et al., 1980) e, ainda, uma óbvia imparidade para estudos de toxicologia aquática.

## **2. A Carpa**

A carpa (*Cyprinus carpio*) é um peixe ósseo, de água doce, caracterizada por apresentar nadadeiras com raios (Orr, 1986). É integrante da família dos Ciprinídeos e possui escamas grandes, nadadeira dorsal longa e duas barbelas ou bigodes de cada lado da boca conhecidos como barbilhões. Não têm dentes no interior da boca, mas sim no começo da garganta (Azevedo, 1981) (Figura I).

É um peixe originário da Ásia e foi introduzido em todos os continentes pela piscicultura de consumo. É cultivado tanto nas áreas temperadas como nas áreas subtropicais e tropicais. No Brasil, a carpa foi introduzida por volta de 1904 (Azevedo, 1981).

É um peixe de crescimento rápido. Sua comida natural é zooplâncton, quando juvenil, e animais de fundo, como minhocas e larvas de insetos, quando adulta. Consome e utiliza bem quase todos os materiais comestíveis, como alimento complementar junto da comida natural. Ela se propaga com bom êxito em águas paradas onde não há outros peixes, especialmente carnívoros (Woynarovich, 1988). Possui uma capacidade excepcional para regenerar várias estruturas, tais como todos os tipos de nadadeiras, espinha cordal e nervo óptico (Nechiporuk & Keating, 2002).

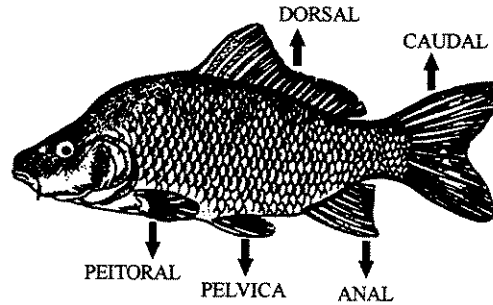


Figura I: Figura da Carpa indicando a localização de suas nadadeiras (Dorsal, Peitoral, Pélvica, Anal e Caudal)

### 3. A estrutura da nadadeira dos peixes teleósteos

A estrutura das nadadeiras dos peixes, de interesse para as pesquisas desde o século 19 (Krukenberg, 1885; Harrison, 1893), continuou a atrair a atenção dos cientistas que estudaram as nadadeiras dos teleósteos (Goodrich, 1904; Prenant, 1936; Blanc, 1947; Grassé, 1958; Lanzing, 1976; Becerra et al., 1983). Esses trabalhos mostram que não existem diferenças fundamentais entre as nadadeiras de um mesmo peixe, ou seja, entre as nadadeiras dorsal, peitoral, pélvica, anal e caudal.

Na maioria dos teleósteos, as nadadeiras consistem principalmente de elementos esqueléticos, os raios da nadadeira, cobertos pela pele (Esquema I). Esses raios originam-se da base da nadadeira e se estendem distalmente, ramificando-se dicotomicamente em direção à margem (Arita, 1971), exceto o raio lateral da nadadeira caudal que não sofre bifurcação (Akimenko, 2003). Cada raio mole (articulado) é conhecido como uma **lepidotriquia**. Cada lepidotriquia, por sua vez, é constituída por um par de estruturas alongadas e curvas dispostas bilateralmente: os demirraios, que são subdivididos longitudinalmente em hemissegmentos lepidotriquiai, separados pelas articulações (Arita,

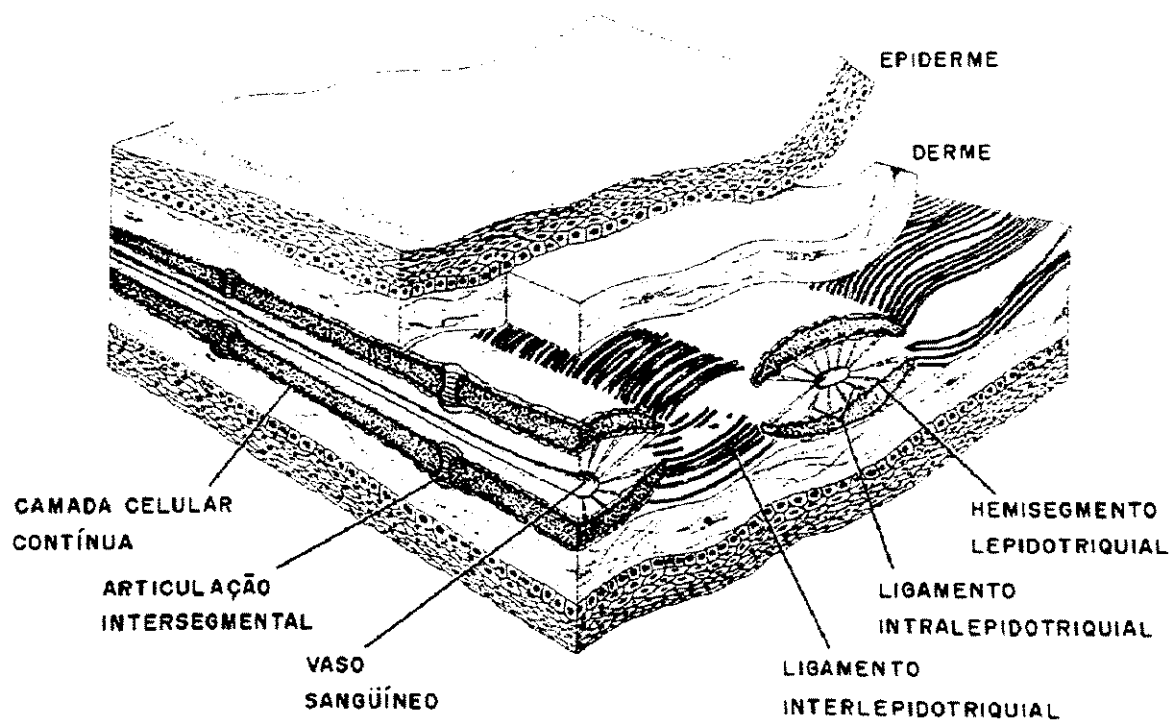
1971). Dois hemissegmentos bilaterais circundam uma região intrassegmentar onde se encontram feixes nervosos, vasos sanguíneos, melanóforos e tecido conjuntivo frouxo. Esses hemissegmentos são mantidos no lugar através de ligamentos de colágeno (Becerra et al., 1983). Cada lepidotriquia é separada da multicamada epidermal que a circunda, por uma típica membrana basal (Montes et al., 1982; Becerra et al., 1983). Estendendo-se da porção distal de cada lepidotriquia em direção à margem da nadadeira, há um conglomerado de espículas pequenas, rígidas e delgadas chamadas **actinotriquias**, que sustentam a borda da membrana da nadadeira (Becerra et al., 1983).

A nível ultraestrutural os hemissegmentos lepidotriquiaais são recobertos por uma camada celular e internamente são preenchidos por uma matriz extracelular contendo fibrilas de colágeno envolvidas por uma substância fundamental calcificada que contém condroitim sulfato (Montes et al., 1982). Sua matriz é rica em glicosaminoglicanos sulfatados que formam proteoglicanos. O colágeno abundante interage fortemente com os glicosaminoglicanos e esta interação aumenta progressivamente com a maturação tecidual. A matriz lepidotriquiaal ainda apresenta, em sua composição, glicoproteínas estruturais ricas em resíduos de manose que têm como função unir os elementos da matriz extracelular entre si e com receptores celulares específicos (Santamaria et al., 1992). Vasos sanguíneos, células pigmentares, nervos e células indiferenciadas semelhantes a fibroblastos estão dispostos no compartimento entre dois hemissegmentos bilaterais (espaço intra-raio), também como no compartimento presente entre as lepidotriquias (espaço inter-lepidotriquiaal) (Johnson & Weston, 1995).

Ontogeneticamente, a lepidotriquia tem uma origem dérmica e é inicialmente sintetizada na interface dermo-epidermal (Santamaria et al., 1992).



A actinotriquia é formada por macrofibrilas hiperpolimerizadas de elastoidina, uma proteína de características semelhante ao colágeno (Krukenberg, 1885). Diferente da lepidotriquia, a actinotriquia não é mineralizada (Géraudie, 1977). Ontogeneticamente, a actinotriquia é a primeira estrutura histológica observada no espaço subepidermal da nadadeira, antes que alguma célula mesenquimal tenha invadido esta área (Garrault, 1936; Bouvet, 1974; Géraudie, 1977). Subseqüentemente, a actinotriquia formada é usada como substrato para migração das células mesenquimais que invadem a área formando o primeiro broto da nadadeira (Wood, 1982; Wood & Thorogood, 1984).



Esquema I: Reconstrução tridimensional da estrutura geral da nadadeira caudal de teleósteo (Becerra et al., 1983).

#### **4. A regeneração das nadadeiras dos teleósteos**

Existem na literatura numerosos trabalhos que relatam o desenvolvimento e a regeneração das nadadeiras dos teleósteos (Nabrit, 1929; Garrault, 1936; Prenant, 1938; Blanc, 1949; Goss & Stagg, 1957; Kemp & Park, 1970; Bouvet, 1974; Géraudie, 1977, 1978; Weis & Weis, 1980; Santamaria et al., 1992; Becerra et al., 1996).

A regeneração que a nadadeira experimenta depois de sua amputação é uma situação em que os mecanismos de controle da forma e do padrão estrutural da nadadeira entram em funcionamento. As fases fundamentais deste processo são idênticas àquelas dos membros de alguns vertebrados, como por exemplo, a capacidade de tetrápodos em regenerar apêndices. Estas fases são: cicatrização, desdiferenciação, formação do blastema (massa de células mesenquimais multipotentes), crescimento e restauração morfológica (Goss & Stagg, 1957). As particularidades que este apêndice apresenta provém de sua estrutura peculiar.

Após a amputação, o tecido conjuntivo presente dentro do raio é selado por um coágulo com numerosas células sanguíneas, principalmente leucócitos, e enquanto isso, células da epiderme lateral migram em direção ao plano de amputação para fechar a ferida. Um dia depois da amputação, a ferida já se encontra completamente fechada a partir da formação de uma capa epidermal apical que é separada do tecido conjuntivo adjacente por uma membrana basal. Durante os 2 ou 3 dias seguintes, ocorre uma migração de fibroblastos oriundos do compartimento mesenquimal proximal (longe do local da excisão) em direção à capa epidermal, com a finalidade de formar o blastema, que é invadido por terminações nervosas (Goss & Stagg, 1957; Santos-Ruiz et al., 2002). A presença destas terminações é decisiva, pois a secção dos nervos do plexo peitoral inibe a regeneração da

nadadeira peitoral (Goss & Stagg, 1957; Géraudie & Singer, 1985), afetando a síntese de proteínas (Géraudie & Singer, 1979 a e b).

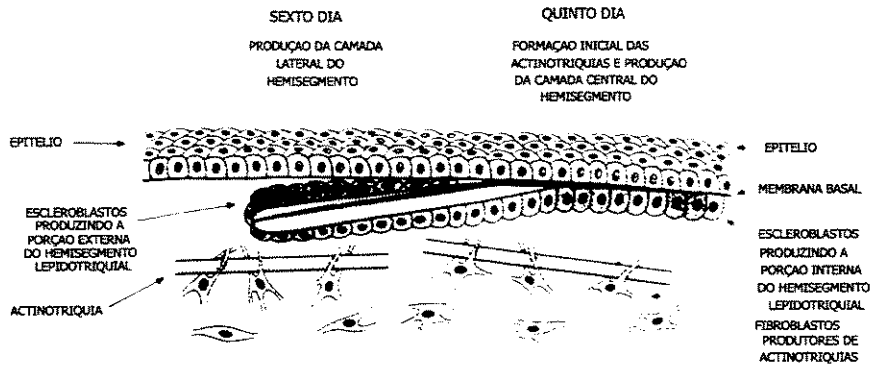
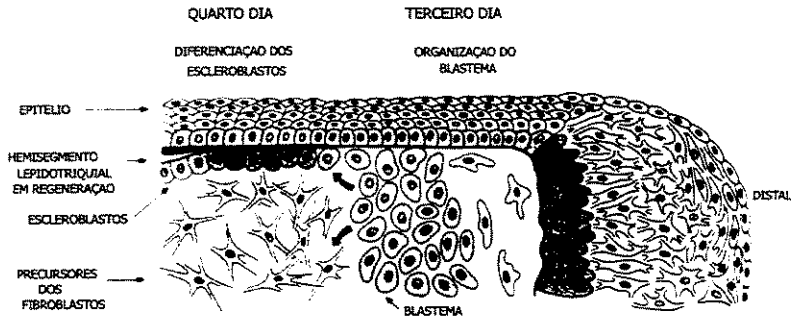
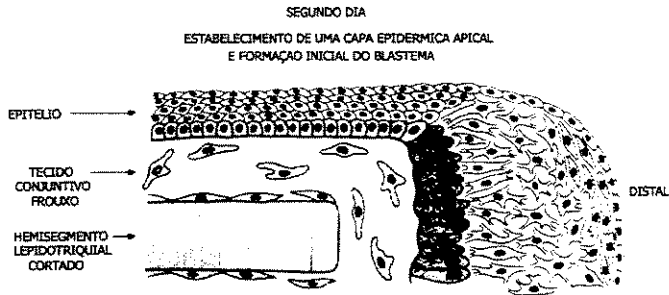
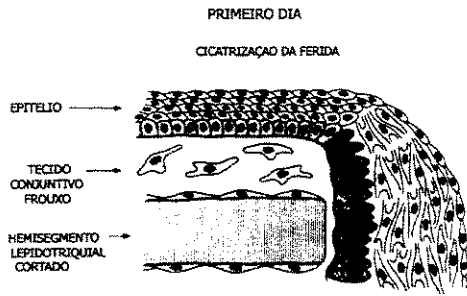
Durante a formação do blastema, a camada epidermal basal, composta de células cubóides, se dispõem de maneira adjacente ao tecido blastemal, sendo separadas apenas pela presença da membrana basal (Poss et al., 2003).

As células desdiferenciadas do blastema, de morfologia homogênea, começam sua diferenciação aderindo à membrana basal da epiderme e iniciando a síntese das lepidotriquias. Essas células diferenciadas são conhecidas como escleroblastos. Quando o hemissegmento lepidotriquial em contato com a membrana basal se encontra evidente, alguns escleroblastos migram ao longo da margem lepidotriquial entrando em contato com a membrana basal, habitando um espaço subepidermal, contribuindo, assim, para o crescimento do hemissegmento através da deposição de matriz na outra face da lepidotriquia. Por volta do quinto dia, inicia-se a segmentação e, aproximadamente no sétimo dia, os raios já se bifurcaram. O padrão de segmentação e ramificação varia nos diferentes animais (Kemp & Park, 1970; Santamaría & Becerra, 1991).

O blastema é formado, então, por duas regiões: uma área distal em contato direto com a capa apical e uma área proximal onde há novas células diferenciadas e onde se inicia a síntese dos componentes da matriz extracelular do raio (Santos-Ruiz et al., 2002).

As actinotriquias aparecem pela primeira vez na matriz do tecido conjuntivo adjacente à epiderme, aproximadamente no quinto e sexto dia de regeneração, encontrando-se rodeadas parcial ou totalmente pelos fibroblastos. A abundância de retículo endoplasmático granular encontrado nessas células indica uma síntese ativa de proteína enquanto a actinotriquia se desenvolve (Kemp & Park, 1970). O tamanho e a distribuição

final do ramalhete de actinotriquias são alcançados quase no décimo dia, mantendo-se em posição distal durante todo o processo (Marí-Befa et al., 1989; Becerra et al., 1996) (Esquema II).



Esquema II: Diagrama ilustrando a seqüência de eventos envolvidos na regeneração dos raios da nadadeira de teleósteos. A regeneração ocorre após excisão parcial da nadadeira. Os tecidos epitelial e conjuntivo estão envolvidos neste processo. O epitélio cobre a extremidade ferida e o tecido conjuntivo subjacente é modificado para restaurar os elementos esqueléticos que estão faltando: lepidotriquia e actinotriquia. Este processo ocorre em uma seqüência de eventos bem estabelecida que pode ser resumida assim:

Após um dia, a ferida está completamente fechada pela epiderme. No segundo dia, a epiderme torna-se espessada na extremidade da nadadeira em regeneração, formando uma capa epidérmica apical. Abaixo desta capa, o espaço interno da nadadeira, imediatamente distal á extremidade ferida da lepidotriquia velha, é preenchido com células do tecido conjuntivo frouxo. Aos 3 dias, o blastema da regeneração está formado de uma massa de células de morfologia homogênea. Aos 4 dias, as células na região proximal do blastema iniciam a sua diferenciação, enquanto as células na região distal permanecem indiferenciadas. A histodiferenciação no blastema da regeneração ocorre para formar os precursores dos escleroblastos ou dos fibroblastos que se dispõem frouxamente no tecido conjuntivo. Os escleroblastos formam uma fileira imediatamente abaixo da epiderme, em íntima associação com a membrana basal. A matriz do hemissegmento em regeneração é inicialmente depositada entre os escleroblastos e a membrana basal.

As actinotriquias podem ser detectadas inicialmente em aproximadamente 5 dias, e geralmente estão envolvidas pelas células do tecido conjuntivo.

Posteriormente, a lepidotriquia em regeneração torna-se separada da epiderme acima pela invasão dos escleroblastos. A fileira de escleroblastos resultante, localizada entre a epiderme e a lepidotriquia em regeneração, secreta matriz extracelular no

hemissegmento em regeneração. Assim, ocorre o espessamento do hemissegmento pelo crescimento aposicional, e as camadas centrais são mais velhas do que as mais externas.

Visto que cada hemissegmento dá lugar ao demirraio distal correspondente, um único exemplo é ilustrado nesta representação esquemática (Becerra et al., 1996).

## **5. Fatores que influenciam a taxa de regeneração**

O crescimento durante a regeneração depende de fatores externos e internos (Buser & Blanc, 1949). Dentre os fatores internos (bióticos), a atividade da tireóide e da hipófise parecem regular a velocidade de crescimento na regeneração (Grassé, 1958). Exames histológicos da tireóide mostraram que esta glândula apresenta características de inatividade durante o período em que não ocorre regeneração. Durante a regeneração a tireóide muda de aspecto e adquire características que revelam seu retorno à atividade. Pode-se dizer que a atividade tireoideana revela um estado geral do organismo que permite a regeneração. Trabalhos sobre a osteogênese em pássaros revelaram que a própria tireóide agiria sobre a osteogênese de forma indireta, favorecendo a formação de matéria protéica óssea (Buser & Blanc, 1949). Da mesma forma que a tireóide, a hipófise também age no processo de regeneração (Bertin, 1958).

Outro fator interno é a necessidade de um suprimento nervoso adequado para que ocorra a regeneração. Secção nervosa na faixa peitoral em teleósteos no momento da amputação da nadadeira peitoral impede a formação do blastema. Quando esta secção é feita após a formação do blastema, a desnervação bloqueia o crescimento do blastema e altera a síntese de macromoléculas (Géraudie & Singer, 1979).

Dentre os fatores externos (abióticos), a temperatura tem sido citada como sendo importante para alguns peixes (Johnson & Weston, 1995). Estes sofrem uma diminuição da velocidade de crescimento durante o inverno, que tem um efeito marcante na regeneração da nadadeira. Existe uma temperatura crítica (de 18°C), abaixo da qual a taxa de regeneração (velocidade de crescimento) diminui muito. No entanto, de acordo com Nechiporuk & Keating (2002) a velocidade de regeneração aumenta na temperatura de



33°C. Uma evidência disso é que o blastema é formado 24 horas após a excisão. Além da temperatura, a luz também pode influenciar a taxa de regeneração. Segundo Buser & Blanc (1949), a regeneração ocorreu em baixas temperaturas quando o aquário foi fortemente iluminado. Entretanto, em temperaturas elevadas a regeneração ocorreu mesmo na escuridão total. Portanto, se a ação da temperatura é primordial, a da iluminação é apenas subsidiária à osteogênese. Pode-se precisar que é mais a intensidade do que a duração da luz que intervém neste caso (Bertin, 1958).

A taxa de regeneração da nadadeira é muito sensível à ação de agentes físicos e químicos externos. O metil-mercúrio, o óleo combustível e outros possíveis agentes contaminantes ambientais retardam a regeneração (Fingerman, 1980), enquanto que o cádmio e o zinco interagem antagonicamente com os anteriores, estimulando o crescimento (Weis & Weis, 1980). Certas drogas como, por exemplo, o beta-aminopropionitrilo, a penicilamina, a dexametasona, o ácido acetilsalicílico e a indometacina inibem a síntese de colágeno e conseqüentemente a regeneração (Bechara et al., 2000).

## **6. O Naproxeno**

O naproxeno é uma droga anti-inflamatória não esteróide, derivada do ácido propiônico, que apresenta três principais tipos de efeito: efeito antipirético (redução da temperatura corporal elevada), efeito analgésico (redução de certos tipos de dor) e efeito anti-inflamatório (modificação da reação inflamatória) moderado. Em geral, todos estes efeitos estão relacionados à ação primária da droga – inibição da ciclooxigenase do ácido araquidônico e, portanto, inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos (Rang et al., 1993), importantes mediadores de processos inflamatórios (Vane, 1971).



É uma droga comumente usada no tratamento clínico de doenças articulares degenerativas (Ratcliffe et al.,1993) como a osteoartrite, a artrite reumatóide, gota e reumatismo das partes moles (Rang et al., 1993), reduzindo a inflamação e proporcionando um alívio sintomático, agindo como anti-inflamatório e analgésico (Glazer et al.,1993). Também é indicado para doenças infecciosas, para usos ginecológicos, usos cirúrgicos e traumáticos, enxaqueca e dor de cabeça e para doenças periarticulares e musculoesqueléticas.

O naproxeno é um sólido cristalino branco, inodoro, muito solúvel em água. No homem, o naproxeno é rápida e completamente absorvido no tubo gastrointestinal após administração oral e, juntamente com seus metabólitos, são essencialmente excretados por via renal.

Quando o naproxeno é usado em doenças articulares, o que geralmente exige doses muito grandes e uso prolongado, há elevada incidência de efeitos colaterais, principalmente no trato gastrointestinal, mas também no fígado, rim, baço, sangue e medula óssea (Rang et al.,1993).

Há evidências de que o naproxeno pode afetar a composição da matriz extracelular de cartilagens. Segundo Srinivas et al. (1994), a síntese de colágeno do tipo II em cultura de condrossarcomas de ratos é inibida na administração de alta concentração de naproxeno (50 µg/mL ou mais), mas não age na síntese de glicosaminoglicanos, contrastando com efeitos inibitórios registrados em outras culturas de condrócitos. Já segundo Ratcliffe et al. (1993), a administração oral de naproxeno na dose de 40-50µg/mL em cães não afetou a composição da cartilagem articular, ou seja, não houve mudança na quantidade de água,

colágeno e proteoglicanos. No entanto, oprimiu o catabolismo dos proteoglicanos, diminuiu a atividade das metaloproteinases, sugerindo a capacidade desta droga em modular a atividade metabólica em tecidos com osteoartrite.

Arumugham et al. (1981) observaram que o naproxeno administrado na dose de 25mg/kg em ratos albinos com artrite acelera a síntese do colágeno e a conversão do colágeno solúvel para o insolúvel, acompanhado pela inibição do catabolismo do colágeno. Já Arumugham et al. (1982) observaram que o naproxeno na dose de 25mg/kg em ratos albinos normais inibe a biossíntese de glicosaminoglicanos sulfatados. Essa inibição ocorre sob a influência do sistema adenilato ciclase (Peters et al., 1975).

Solheim et al. (1986) estudaram o efeito do naproxeno na síntese e mineralização do colágeno em fêmur de ratos e, na dose de 20mg/kg/12h, apenas a deposição mineral foi reduzida. No processo de cicatrização de feridas, o naproxeno, administrado em ratos na dose de 10mg/kg<sup>-1</sup>, diminuiu significativamente a deposição de colágeno (Muscará et al., 2000).

O naproxeno na dose de 100µg/mL inibiu a proliferação de células de tendão humano (tendão de patela e tendão de flexor digital) e inibiu a síntese de glicosaminoglicanos *in vitro*, indicando que essa dose farmacológica tem um efeito deletério no metabolismo da matriz do tendão e nos processos reparadores (Riley et al., 2001).

Smith et al. (1995) utilizaram naproxeno na dose de 10, 30 e 90µg/mL em condrócitos de cartilagem articular de humano adulto *in vitro* e constataram que a droga, nestas concentrações, não afeta a síntese de colágeno. Já em culturas secundárias de

condrócitos de coelhos, o naproxeno inibiu a síntese de glicosaminoglicanos em altas concentrações (100µg/mL), mas não em baixas concentrações (4µg/mL) (Bjelle & Eronen, 1991).

De acordo com Sadowski et al. (2001), o naproxeno não só age contra os sintomas das doenças articulares, como também interfere na atividade e na expressão da metaloproteinase. Os autores observaram que condrócitos da cartilagem articular bovina quando incubados com naproxeno na concentração de 10µM sofreram uma redução significativa na atividade da metaloproteinase-1 (MMP-1:colagenase, responsável pela quebra do colágeno tipo II) e/ou na expressão do RNA mensageiro de MMP-1, no entanto não reduziu o efeito da atividade da metaloproteinase-3 (MMP-3:estromelina, responsável pela degradação do agregado) e nem interferiu na expressão do mRNA e nem na síntese da proteína MMP-3; além disso, o naproxeno não inverteu os efeitos inibitórios de interleucina-1 (IL-1) na expressão de TIMP-1 (inibidor tecidual de metaloproteinase) aumentando a expressão e atividade das MMPs na presença de IL-1, destruindo a cartilagem articular durante a osteoartrite e a artrite reumatóide.

Estudos experimentais utilizando naproxeno (10mg/kg) durante a regeneração do músculo gastrocnêmio de ratos (Thorsson et al., 1998) mostraram que a proliferação de células satélites e fibroblastos não foram afetados pelo tratamento e que não houve diferença significativa na produção de miofibras (fusão de células satélites necessárias para a formação de miofibras) e capilares entre animais controle e tratados.

## JUSTIFICATIVA

A rápida regeneração que o tecido lepidotriquial apresenta permite que as nadadeiras dos peixes teleósteos sejam usadas como modelo biológico para o estudo do crescimento dos tecidos conjuntivos. Esse modelo permite, por exemplo, analisar *in vivo* o efeito de drogas durante o crescimento do tecido lepidotriquial.

Sabe-se, por relatos na literatura (Srinivas et al., 1994; Bechara et al., 2000), que as drogas anti-inflamatórias esteróides e não esteróides interferem com a síntese do colágeno e dos proteoglicanos dos tecidos conjuntivos. Certas drogas anti-inflamatórias como a indometacina, a dexametasona, a aspirina, a D-penicilamina e o beta-aminopropionitrilo, têm comprovado efeito sobre o processo regenerativo das lepidotriquias (Bechara et al., 2000). No entanto, não há relatos na literatura sobre o efeito do naproxeno nas nadadeiras dos teleósteos durante a regeneração. Além disso, os resultados sobre os efeitos desta droga em tecidos conjuntivos de outras espécies de animais são controversos.

## **OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos do naproxeno sobre a síntese da matriz lepidotriquial das nadadeiras caudais das carpas durante o processo de regeneração, tendo por base, uma avaliação histoquímica e ultra-estrutural das alterações na matriz lepidotriquial e uma avaliação da velocidade de regeneração das estruturas caudais nos animais tratados quando comparados com os animais controle.

**ARTIGO SUBMETIDO AO**  
**“JOURNAL OF SUBMICROSCOPIC CYTOLOGY AND**  
**PATHOLOGY”**



# EFFECT OF NAPROXEN ON TAIL FIN REGENERATION IN TELEOST

P. K. BÖCKELMANN \*; I. J. BECHARA \*

\* Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, UNICAMP.  
Campinas (SP) Brazil 13083-970.

running title: naproxen in tail fin regeneration

Key Words: *fin - lepidotrichia - regeneration - collagen - glycosaminoglycan -  
naproxen - teleost*

---

*Mailing address:* Prof. Ivanira José Bechara, Department of Histology and  
Embryology, Institute of Biology. UNICAMP. Campinas, SP, 13083-970, Brazil; e-  
mail: [ibechara@unicamp.br](mailto:ibechara@unicamp.br)



## ABSTRACT

In the present investigation we studied the effect of naproxen, a non-steroidal anti-inflammatory drug used for the treatment of rheumatic disease, on the synthesis of the lepidotrichial matrix of the tail fin of the teleost fish *Cyprinus carpio* (carp) during the regeneration process. Observations were carried out by standard and polarized light microscopy and by transmission electron microscopy. In general, naproxen at the dose used in the present study did not affect the organization of the extracellular matrix components and the mineralization of the fundamental substance of the lepidotrichia during the process of tail fin regeneration. Since the effect of naproxen, as well as of other non-steroidal anti-inflammatory drugs, depends on the dose used, the route of administration and the metabolism of the animal in which the drug is being tested, higher doses of the drug may perhaps delay or even fully inhibit this process, possibly also provoke disorganization of the lepidotrichial matrix.

## INTRODUCTION

The structure of the tail fin of teleost fish mainly consists of skeletal elements, the fin rays, covered with skin. These rays originate from the fin base and extend distally, branching out in a dichotomous manner towards the margin. Each articulated ray is known as a **lepidotrichium**. Each lepidotrichium consists of a pair of elongated and curved structures arranged bilaterally, the demirays, which are subdivided longitudinally into lepidotrichial hemisegments separated by the articulations (Arita, 1971). Two bilateral hemisegments surround an intrasegmental region containing nerve bundles, blood vessels, melanophores, and loose connective tissue. These hemisegments are kept in place by collagen ligaments (Becerra *et al.*, 1983). Extending from the distal portion of each lepidotrichium towards the margin of the fin there is a cluster of small, rigid and fine spicules called **actinotrichia**, which support the border of the fin membrane (Becerra *et al.*, 1983). At the ultrastructural level, the lepidotrichium is filled with extracellular matrix containing collagen fibrils of different orientations surrounded by a calcified fundamental substance that contains chondroitin sulfate (Montes *et al.*, 1982). The actinotrichium is formed by hyperpolymerized macrofibrils of elastoidin and, in contrast to the lepidotrichium, is not mineralized (Krukenberg, 1885; Géraudie, 1977).

After amputation, the fins of teleosts show a very fast capacity for regeneration. The fundamental phases of this process are: healing starting from the cells of the lateral epidermis, dedifferentiation, blastema formation (mass of multipotent mesenchymal cells), differentiation of blastema cells into scleroblasts, synthesis and deposition of extracellular matrix, growth, and morphological restoration (Goss and Stagg, 1957; Santamaría and

Becerra, 1991; Géraudie and Singer, 1992; Santos-Ruiz *et al.*, 2002; Akimenko *et al.*, 2003). The regeneration process depends on an adequate nerve supply and also on the activity of thyroid and hypophysis hormones that appear to regulate the growth rate in regeneration (Grassé, 1958; Géraudie and Singer, 1985).

The rate of fin regeneration is highly sensitive to the action of external physical and chemical agents. Some drugs such as beta-aminopropionitrile, penicillamine, dexamethasone, acetylsalicylic acid and indomethacin inhibit collagen synthesis and consequently the regeneration of teleost fins (Bechara *et al.*, 2000).

Naproxen is a nonsteroidal anti-inflammatory drug commonly used for the clinical treatment of degenerative joint diseases (Ratcliffe *et al.*, 1993) such as osteoarthritis, rheumatoid arthritis, gout, and soft parts rheumatism, reducing inflammation and providing symptom relief by acting as an anti-inflammatory and analgesic agent (Glazer *et al.*, 1993). There is evidence that naproxen can affect the composition of the extracellular matrix of cartilage by inhibiting the synthesis of type II collagen (Srinivas *et al.*, 1994) and of glycosaminoglycans (Bjelle and Eronen, 1991). Naproxen also reduces collagen deposition in wound healing (Muscará *et al.*, 2000). On the other hand, other studies have reported that collagen and sulfated glycosaminoglycan synthesis is not reduced after naproxen administration (Ratcliffe *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1995).

On this basis, the objective of the present study was to assess the effects of naproxen on the synthesis, deposition and organization of the lepidotrichial extracellular matrix components of the tail fins of carp during the regeneration process.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Fish***

Carp (*Cyprinus carpio*) alevins from a fish farm weighing on average 3 g and measuring on average 6 cm in length were maintained in plastic aquaria containing clear dechlorinated water at a temperature between 22°C and 24°C and under constant aeration. The fish were fed fish ration daily.

### ***Experimental procedure***

At the beginning of the experiment, 2 glass aquaria containing 6 liters of water each were set up. Naproxen (SYNTEX) at the dose of 10.4 mg/L was dissolved in one of them, while the other contained only water and was used to house control fish. Forty-two alevins were anesthetized with benzocaine (SYNTH) (1:10000) and their tail fins were amputated transversely (in the dorsoventral direction) at a distance of 3 mm from the muscle peduncle of the tail using a sharpened razor blade (as described by Becerra *et al.*, 1996). After amputation, the fish were divided into 2 groups of 21 animals each. One group was placed in the aquarium containing dissolved naproxen and the other was placed in the control aquarium. The fish were left in the aquaria until the occurrence of regeneration. Half the water in each aquarium was exchanged daily with clean water until the end of the experiment and half the dose of naproxen, 5.2 mg/L, was added to the experimental aquarium.

The animals were anesthetized and sacrificed and the regenerating fins were excised and fixed at intervals of 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days after amputation. Three specimens per time point were used.

## *Histology*

The collected samples were processed for light microscopy and for transmission electron microscopy.

- Sample preparation for light microscopy: the regenerating fins were fixed in Bouin's solution for 6 hours and embedded in paraffin. Longitudinal 6 $\mu$ m thick fin sections were stained with Picrosirius-Hematoxylin and Toluidine Blue, pH 4.0, and observed and photographed with a microscope with standard light and with polarized light (for the sections stained with Picrosirius-Hematoxylin).
- Sample preparation for transmission electron microscopy: Small fragments of regenerating fins were fixed in Karnovsky for 4 hours at 4°C, washed with a 0.1 M phosphate buffer solution containing 7.5% saccharose and then postfixed with 1% osmium solution in 0.2 M phosphate buffer for 1 hour at 4°C. The samples were then washed with glycosated saline, dehydrated with increasing acetone concentrations, pre-embedded in a mixture of acetone and epon (1:1) for 3 hours and embedded in pure epon for 24 hours. The embedded tissue fragments were polymerized in an oven at 60°C for 48 hours. Semi-thin (1  $\mu$ m) sections were cut with a LEICA ultramicrotome and stained with Toluidine Blue. Ultrathin sections (60-70 nm) were then obtained and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined and micrographed with a transmission electron microscope (LEO 906).

## RESULTS

### *Histology of regeneration in control animals*

When examined by light and transmission electron microscopy, the fish in the control aquarium presented regeneration of the tail fin as reported in the literature (Becerra *et al.*, 1996).

After amputation, blood loss was minimal and repair started immediately after the lesion. After 1 day of regeneration (1 D.R.) epidermal cells fully covered the cut border at the distal end of the tail fin (amputated region of the fin) (Fig. 1). At 2 D.R. the regenerating epidermis (also known as epidermal cap) was already well established.

At 4 D.R. there was formation and organization of the blastema (a cell mass of homogeneous aspect) (Fig. 2). We also observed that some cells of the blastema formed an row of cells arranged side by side and immediately below the epidermis in intimate association with the basement membrane on both sides of the fin (Fig. 2). These cells, called scleroblasts, initiated the synthesis and deposition of extracellular matrix of the lepidotrichia in the region facing the basement membrane and therefore between the row of scleroblasts (Fig. 3) and the epidermal basement membrane (Fig. 4). Thus, the scleroblasts are polarized cells.

At 6 D.R., it could be seen that the fin as a whole had grown (Fig. 5). The scleroblasts migrated to the other side of the hemisegment of the regenerating lepidotrichia and were interposed between the epidermis and the hemisegment, maintaining the arrangement of a single cell layer, now surrounding the two sides of the lepidotrichial

hemisegment, and started to secrete extracellular matrix towards the side facing the hemisegment (Fig. 6).

After 8, 10 and 12 days of regeneration, the lepidotrichia became elongated due to a proximal-distal growth, increasingly growing in length (Fig. 7). Thickness also increased due to the action of the scleroblasts which deposited extracellular matrix, being responsible for thickening of the hemisegment through appositional growth (the central lepidotrichial layers are older than the outer ones) (Fig. 9).

Picrosirius-stained histological sections examined under polarized light showed that both old lepidotrichium (those that did not undergo regeneration) and regenerating ones were bright, reddish or yellowish in color against a dark background, showing the presence of organized molecules in the extracellular matrix, as is the case for collagen molecules (Figs. 8 and 10).

In histological sections stained with Toluidine Blue, the scleroblasts were found to be strongly basophilic (basophilic cytoplasm, prominent nucleoli and loose chromatin), showing intense synthesis of the lepidotrichial matrix. The old lepidotrichial rays and the regenerating ones exhibited weak basophilia (for a review, see Mari-Beffa, 1996) (Fig. 11).

With extracellular matrix deposition towards the side facing the hemisegment, we then observed two light (less electron-dense) regions, one facing the basement membrane and the other facing the hemisegment, and a central dark (more electron-dense) region. The two light regions corresponded to the extracellular matrix newly synthesized by the scleroblasts, permitting an easy visualization of the collagen fibrils since there was no deposition of calcium salts. In contrast, the dark central region described as nucleation center (calcium salt deposits) by Kemp *et al.* (1968), showed a fundamental mineralized

substance that obscured the collagen fibrils, indicating that this region was in a more advance level of regeneration than the two light regions surrounding it (Fig. 12).

### ***Histology of regeneration in the animals treated with naproxen***

After amputation, the regeneration of the animals treated with naproxen occurred in a manner similar to that observed in control animals. After 1 day of regeneration, the wound was closed and after 2 D.R. the regenerating epidermis was fully established.

After 4 D.R. there was the formation and organization of the blastema and the scleroblasts formed an row of cells immediately below the epidermis and started the synthesis and deposition of lepidotrichial matrix in the region facing the basement membrane, events similar to those observed in control animals on the same day of regeneration. However, light microscopy showed that regeneration was lower in length in treated fish than in controls, as could be clearly seen in the fins at 4 D.R. (compare Fig. 2 with Fig. 13).

After 6, 8, 10 and 12 D.R., the fin grew as a whole. As observed in control animals, the scleroblasts migrated to the other side of the hemisegment of the regenerating lepidotrichia, now surrounding the two sides of the lepidotrichial hemisegment. The scleroblasts started to secrete extracellular matrix towards the side facing the hemisegment and were responsible for the thickening of the latter through appositional growth (Fig. 14).

Picrosirius-stained histological sections of both treated and control animals observed under polarized light presented regenerating lepidotrichia that were bright, reddish or yellowish in color against a dark background, demonstrating collagen organization in the extracellular matrix (Fig. 15).



A nucleation center arose in the central region of the lepidotrichia (Figs. 16 and 17) and sections stained with Toluidine Blue showed strongly basophilic scleroblasts and weakly basophilic lepidotrichial rays (Fig. 18), as also observed in control animals.

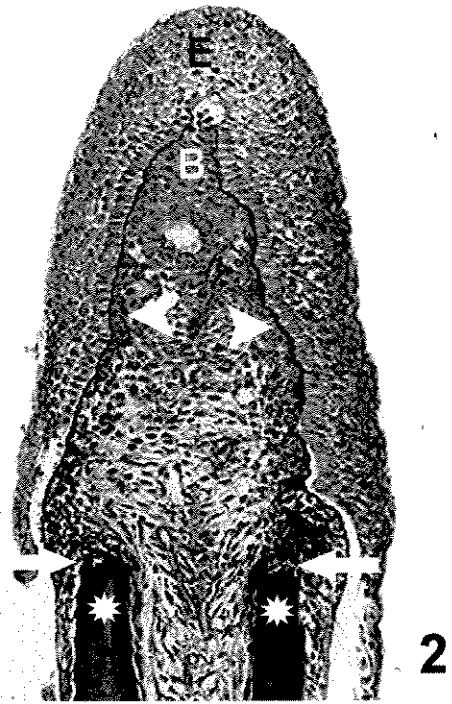
## **FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1** Longitudinal section through the distal end of a regenerating tail fin of a control animal 24 hours after amputation (1 day of regeneration). Observe that the regenerating epidermis (E) has already fully covered the amputated region of the tail fin (arrows). Note the loose connective tissue (C) between the lepidotrichial hemisegments (asterisks). Picrosirius-hematoxylin, x 770.

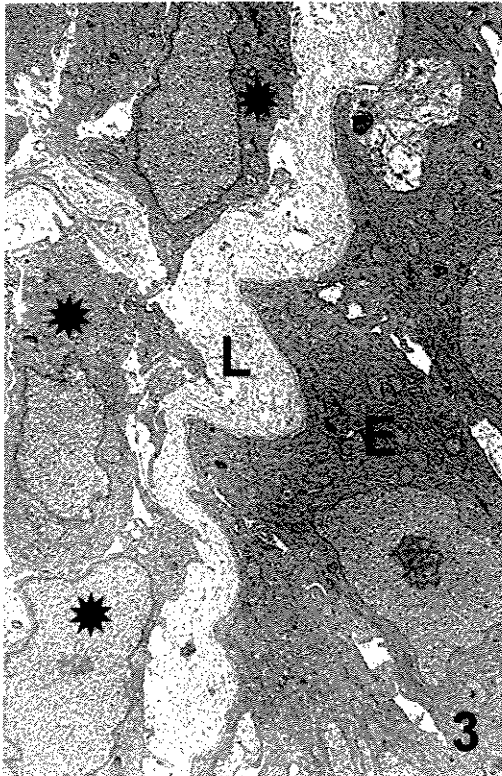
**FIGURE 2** Longitudinal section of the tail fin of a control animal after 4 days of regeneration (D.R.). Observe the epidermis (E), the old lepidotrichium (asterisks), the blastema (B), and the row of cells (scleroblasts) (arrowheads) in association with the basement membrane. The arrows indicate the site of amputation. Note the length of the regenerated region (arrows up to the tail fin tip). Picrosirius-hematoxylin, x 240.

**FIGURE 3** Electron micrograph of a longitudinal section of a regenerating tail fin of a control animal, 4 days after amputation. Observe the already regenerated epidermis (E), the regenerating lepidotrichial hemisegment (L), and the layer of scleroblasts (asterisks) responsible for the synthesis and deposition of the lepidotrichial matrix. X 5000.

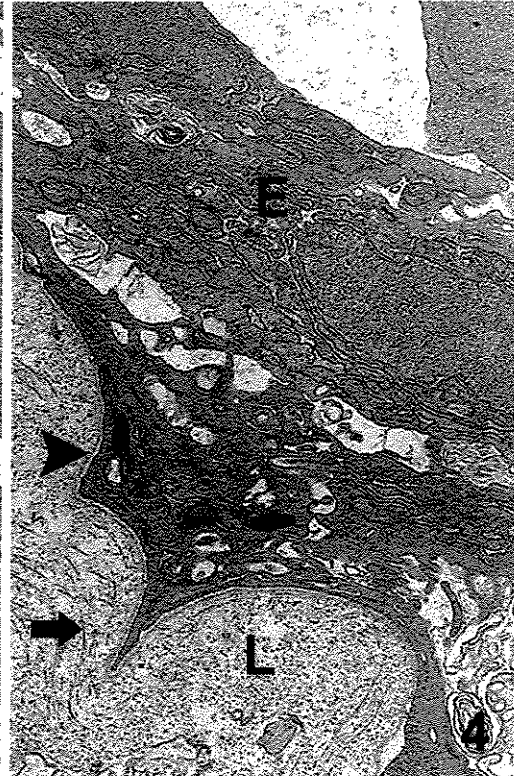
**FIGURE 4** Electron micrograph of a longitudinal section of the tail fin of a control animal after 4 days of regeneration. Observe the epidermal cell (E), the basement membrane (arrowhead) in intimate contact with the epidermis and the regenerating lepidotrichium (L). Note the collagen fibrils in longitudinal sections (arrow). x 10453.



2



3



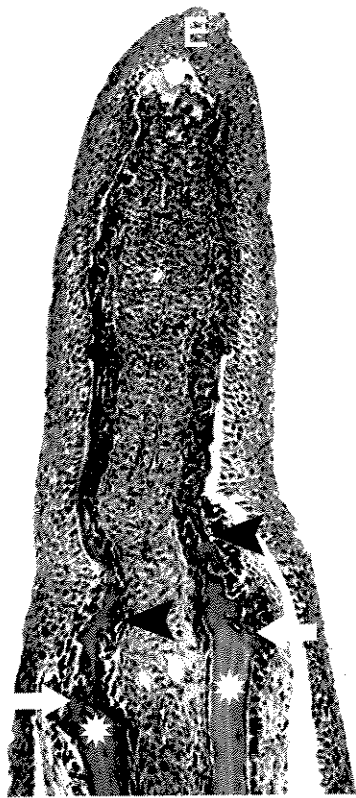
4

**FIGURE 5** Longitudinal section of the tail fin of a control animal after 6 days of regeneration. Observe the epidermis (E), the old lepidotrichium (asterisks), and the regenerating lepidotrichium (arrowheads). Note the length of the regenerated region (arrows up to the tail fin tip). Picrosirius-hematoxylin, x 144.

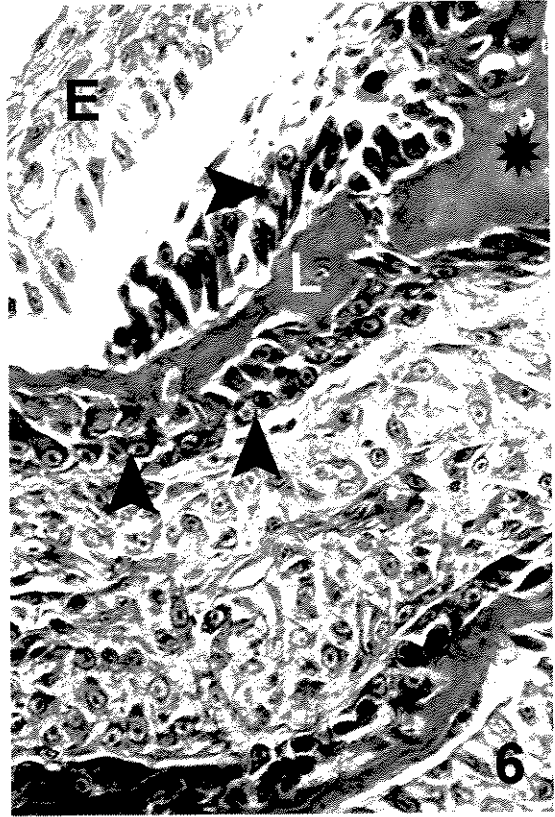
**FIGURE 6** Longitudinal section of the tail fin of a control animal after 6 days of regeneration. Observe the arrangement of a single scleroblast layer (arrowheads) surrounding the two sides of the lepidotrichial hemisegment. Epidermis (E), regenerating lepidotrichial hemisegment (L) and the old lepidotrichium (asterisk). Picrosirius-hematoxylin, x 490.

**FIGURE 7** Longitudinal section of the tail fin of a control animal after 8 days of regeneration, stained with Picrosirius-hematoxylin and observed under standard illumination. From the arrows to the tail fin tip, observe the proximal-distal growth of the lepidotrichium. The arrowheads indicate the regenerating lepidotrichia. x 52.

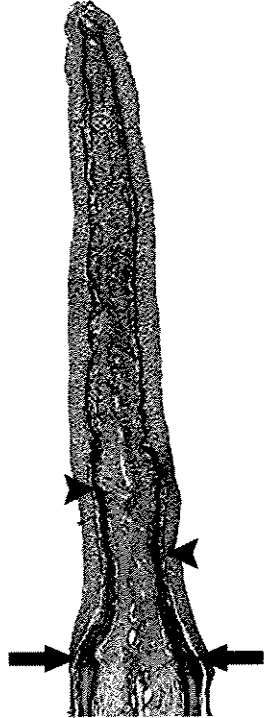
**FIGURE 8** Same section as in **FIGURE 7** stained with Picrosirius-hematoxylin and observed under polarized light. The arrowheads indicate the regenerating lepidotrichium. The collagen molecules present in the lepidotrichial matrix are strongly birefringent, appearing bright against a dark background. x 52.



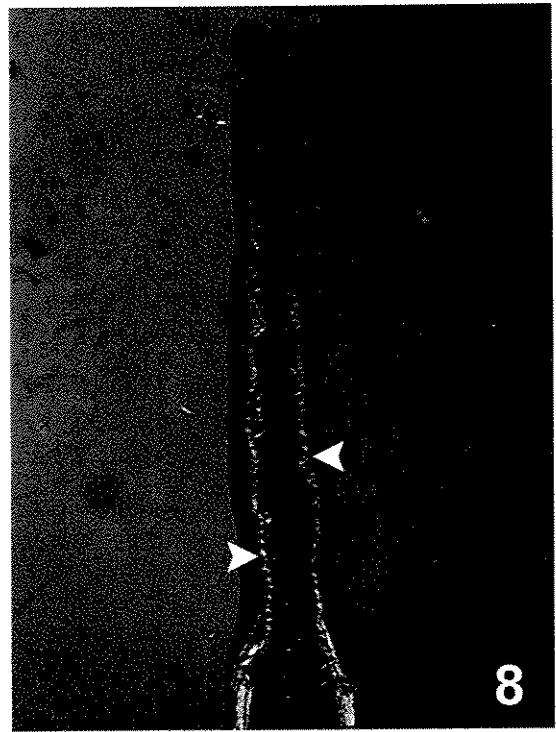
5



6



7



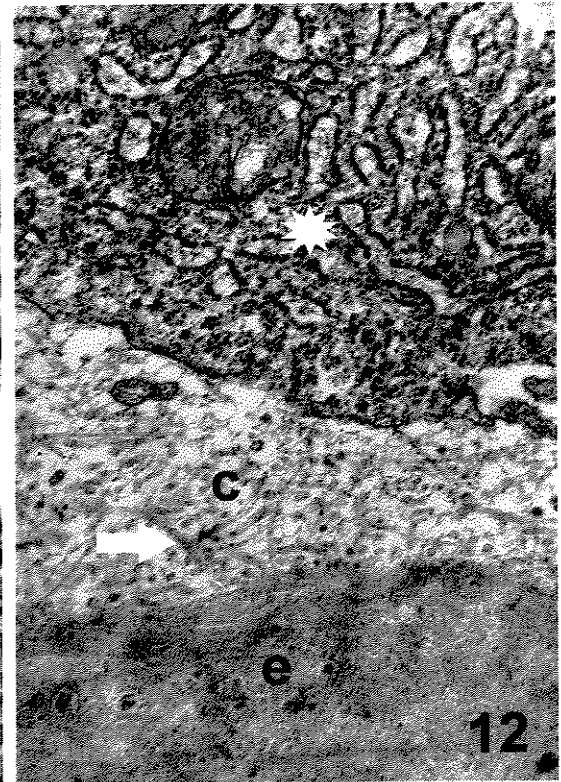
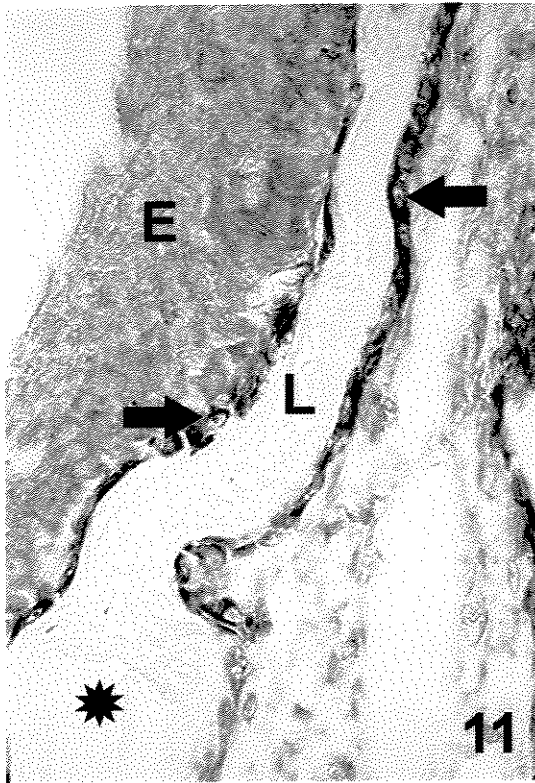
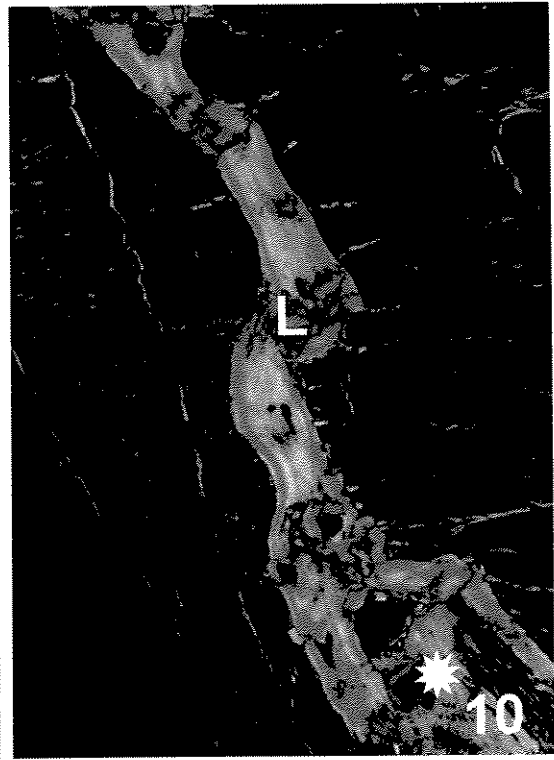
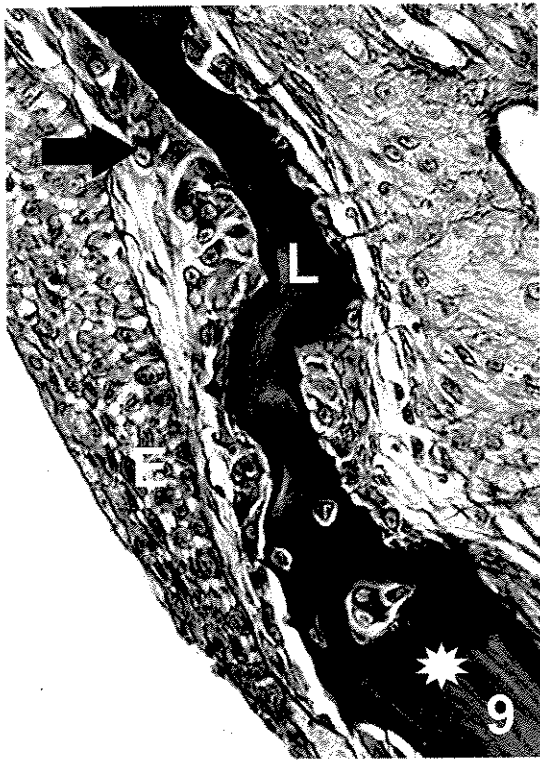
8

**FIGURE 9** Enlarged detail of **FIGURE 7** (a control animal after 8 days of regeneration). Note the increased thickness of the lepidotrichium (L) caused by the action of the scleroblasts (arrow). Also observe the old lepidotrichium (asterisk) and the epidermis (E). Picrosirius-hematoxylin, x 640.

**FIGURE 10** Same section as in **FIGURE 9** stained with Picrosirius-hematoxylin and studied under polarized light. Observe the old lepidotrichium (asterisk) and the regenerating lepidotrichium (L). Note the brightness of the collagen molecules present in the lepidotrichial matrix against a dark background. x 640.

**FIGURE 11** Longitudinal section of the tail fin of a control animal after 12 days of regeneration. Observe the scleroblasts (arrows) surrounding the regenerating lepidotrichial hemisegment (L). Old lepidotrichium (asterisk), epidermis (E). Toluidine Blue, x 476.

**FIGURE 12** Electron micrograph of a longitudinal section of a regenerating lepidotrichia of a control animal 8 days after amputation, showing a light, less electron-dense region (c) and a dark, more electron-dense region (e). In the less electron-dense region, observe collagen fibrils arranged in various directions (arrow). Note the cytoplasm of the scleroblast (asterisk) containing granular endoplasmic reticulum and mitochondria. x 69444.



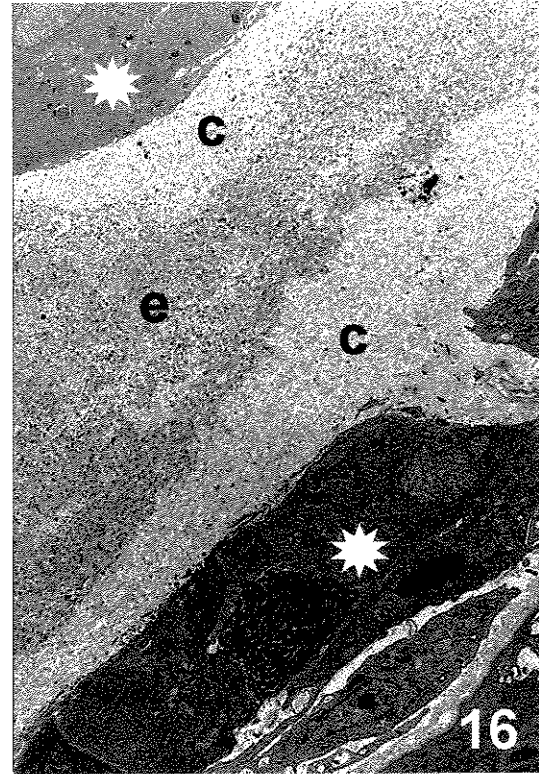
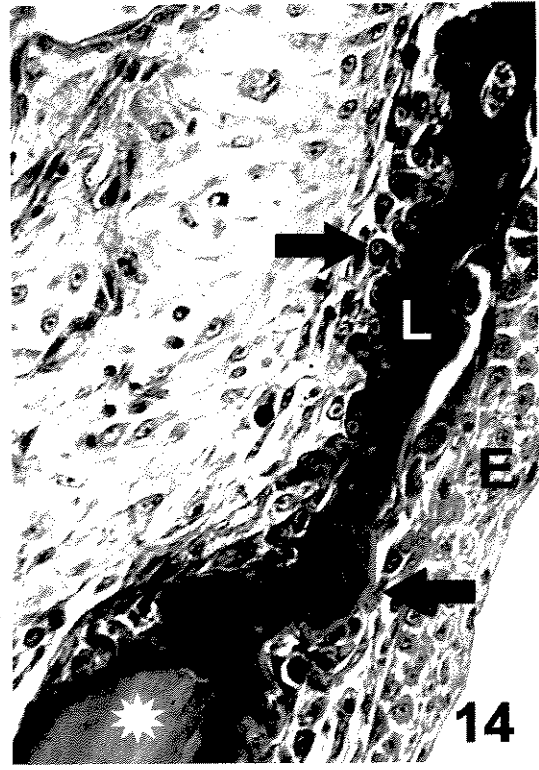
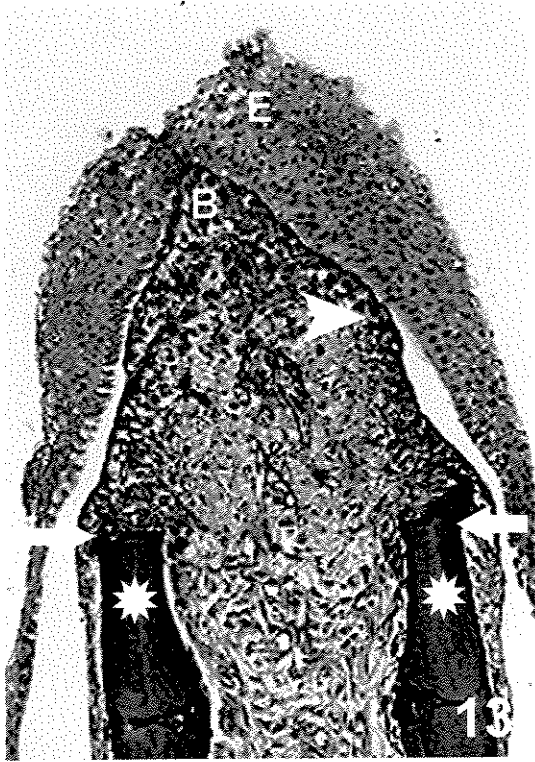
**FIGURE 13** Longitudinal section of the tail fin of a naproxen-treated animal after 4 days of regeneration. Observe the epidermis (E), the old lepidotrichium (asterisks), the blastema (B), and the row of cells (arrowhead) in association with the basement membrane. Note the length of the regenerated region (arrows up to the tail fin tip). Compare with **FIGURE 2**. Picrosirius-hematoxylin, x 241.

**FIGURE 14** Longitudinal section of the tail fin of a treated animal after 8 days of regeneration. Note the increased thickness of the regenerating lepidotrichium (L) due to the action of scleroblasts (arrows), the old lepidotrichium (asterisk), and the epidermis (E). Picrosirius-hematoxylin, x 420.

**FIGURE 15** Same section as in **FIGURE 14** stained with Picrosirius-hematoxylin and observed under polarized light. Observe the old lepidotrichium (asterisk) and the regenerating lepidotrichium (L). The collagen molecules present in the lepidotrichial matrix are strongly birefringent, appearing bright against a dark background. x 420.

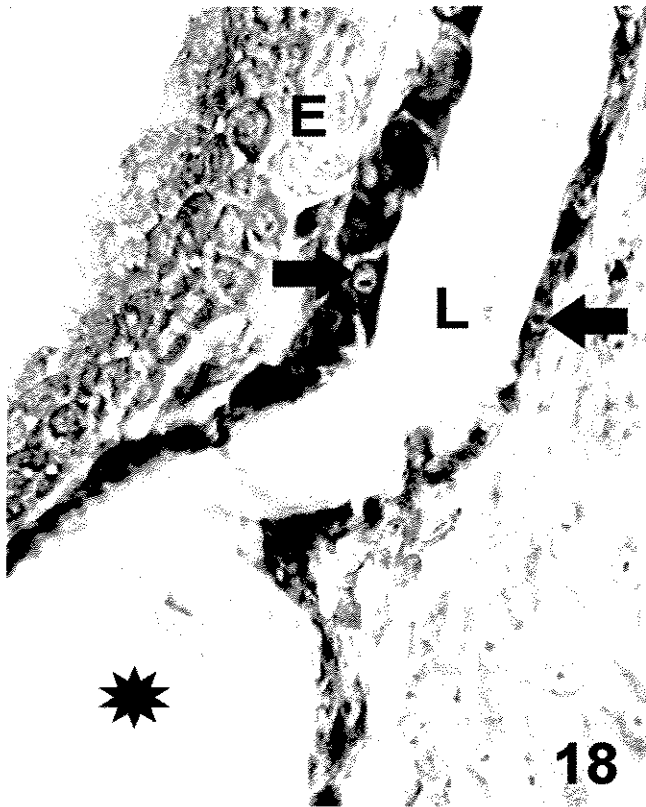
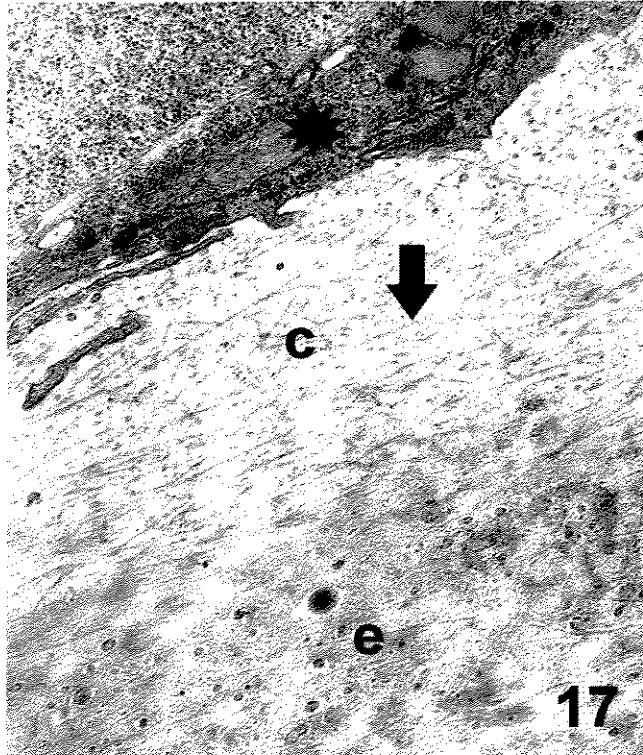
**FIGURE 16** Electron micrograph of a longitudinal section of the tail fin of a treated animal after 8 days of regeneration. Observe the lepidotrichium with two less electron-dense regions (c) surrounding a more electron-dense region (e). Note that the lepidotrichium is surrounded by scleroblasts (asterisks). x 3354.





**FIGURE 17** Longitudinal section of the tail fin of a naproxen-treated animal after 10 days of regeneration. Observe the scleroblast (asterisk), the less electron-dense region (c), with collagen fibrils in a longitudinal section (arrow) and the more electron-dense region (e) of the regenerating lepidotrichium. Compare with **FIGURE 12**. x 29546.

**FIGURE 18** Longitudinal section of a treated animal after 8 days of regeneration. Observe the scleroblasts (arrows) surrounding the regenerating lepidotrichial hemisegment (L). Old lepidotrichium (asterisk), epidermis (E). Toluidine Blue, x 840.



## DISCUSSION

Injured organs of vertebrate animals repair their losses by two mechanisms: repair or regeneration. Repair is characterized by strong inflammation, fibrosis and formation of a collagen-rich connective tissue scar. Regeneration is the process by which injured or lost structures are perfectly or almost perfectly replaced. Mammals possess some organs that are able to regenerate, such as the liver, but most damaged organs form a scar. In contrast, many invertebrates and lower vertebrate species have the ability to regenerate body parts (Dinsmore, 1991).

Similarly to teleost fish, some urodelic amphibians can fully regenerate various appendages formed by different tissues. The process undergone by the animal to restore lost body parts is called epimorphic regeneration (Akimenko, 2003). This process involves the closure and reepithelialization of the wound and the recruitment of mesenchymal cells to form the blastema, a mass of cells that differentiate and start the precise replacement of the damaged limb. This process requires a precise coordination of cell proliferation, cell differentiation, morphogenesis, and specimen formation (Santos-Ruiz, 2002).

In view of the above considerations, because of its simple anatomy, the tail fin of this teleost is a convenient organ for the study of regeneration processes.

In the present study, after excision of a portion of the tail fin of *Cyprinus carpio*, regeneration started and progressed as reported in the literature in the control group (Becerra *et al.*, 1996).

The present description is based on standard light and polarized light microscopy and transmission electron microscopy observations which permitted the visualization of the process of lepidotrichia regeneration in fish treated or not with naproxen.

In the control animals, the first sign of tail fin regeneration as a whole was observed during the very first days after excision (1 and 2 days of regeneration), as shown by epidermal cells fully covering the cut edge, forming a well-established epidermal cap. The initial observation of lepidotrichial regeneration was made on the fourth day of regeneration, when we observed blastema formation and organization, scleroblast differentiation and the beginning of extracellular matrix deposition for the formation of the new regenerating ray. During the later days of regeneration, the lepidotrichia increased in size and thickness through the deposition of extracellular matrix synthesized and secreted by the scleroblasts until the end of the regeneration process.

In histological sections stained with Toluidine Blue, the scleroblasts were found to be strongly basophilic, showing intense synthesis of the lepidotrichial matrix. The old lepidotrichial rays and the regenerating ones exhibited weak basophilia, indicating a progressive masking of the lepidotrichial components due to molecular reorganization and interaction (collagen-proteoglycan interaction) (for a review, see Marí-Beffa, 1996).

According to literature reports (Arumugham *et al.*, 1981 and 1982; Bjelle and Eronen, 1991; Ratcliffe *et al.*, 1993; Srinivas *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995; Muscará *et al.*, 2000), naproxen may or may not affect the composition of the extracellular matrix depending on the dose used.

In the present study, naproxen-treated fish showed a small delay in tail fin regeneration compared to control. However, the histochemical and ultrastructural data show

that the synthesis and deposition of collagen and glycosaminoglycans occurred. The data also suggest that the arrangement of collagen fibrils, as well as the mineralization of the fundamental substance were not unchanged in the presence of naproxen at the dose used.

Bechara *et al.* (2000) studied the effect of 5 steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs (indomethacin, aspirin, dexamethasone, penicillamine and beta-aminopropionitrile) on the tail fin regeneration of two teleost species, *Tilapia rendalli* and *Cyprinus carpio*. In contrast to our observations in the present study, these authors observed that these drugs affect collagen metabolism, impairing the deposition and organization of collagen fibrils at the ultrastructural level, with the consequent formation of an abnormal or practically absent lepidotrichia, in addition to the formation of disorganized fibrous connective tissue.

The presence of the blastema is known to be fundamental for the occurrence of lepidotrichia regeneration (Santamaría *et al.*, 1996) since scleroblasts originate from blastema cells.

We believe that in the present study naproxen, at the dose used, may have affected some blastema cells or some scleroblasts, causing a small delay in the regenerative process. This effect may have involved gene transcription. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that some anti-inflammatory agents act by reducing gene transcription in cells that synthesize collagen, thus reducing collagen synthesis (Fujii *et al.*, 1989). We believe that higher doses may affect a larger number of cells and cause a more marked decrease in lepidotrichial regeneration.

Molecular studies of the effect of naproxen on the regeneration of the lepidotrichial matrix of the tail fins of teleosts could be performed in the future. This simple and at the same time efficient model permits the *in vivo* study of the effects of this and other drugs.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CAPES/DS and Fundo de Apoio ao Ensino à Pesquisa da UNICAMP (FAEP/UNICAMP n° 201/02). The authors thank Kelen Fabíola Arrotéia and Valdemar Paffaro Júnior for artwork assistance, and Cleusa de Oliveira Franco for technical assistance.

## REFERENCES

AKIMENKO M., MARÍ-BECCA M., BECERRA J. and GÉRAUDIE J., 2003. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics*, **226**, 190-201.

ARITA G. S., 1971. A re-examination of the functional morphology of the soft-rays in teleosts. *Copeia*, **4**, 691-697.71.

ARUMUGHAM, R.; BOSE, S. M. Effect of indomethacin and naproxen on the metabolism of collagen in adjuvant-induced arthritis. *Scand. J. Rheumatology*, **10**: 161-167, 1981.

ARUMUGHAM, R.; BOSE, S. M. Effect of indomethacin and naproxen on the metabolism of glycosaminoglycans. **Scand. J. Rheumatology**, **11**: 225-229, 1982.

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

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

BECHARA I. J., JOAZEIRO P. P., MARÍ-BEFFA M., BECERRA J. and MONTES G. S., 2000. Collagen-affecting drugs impair regeneration of teleost tail fins. *Submicroscopic Cytology and Pathology*, **32** (2), 273-280.

BJELLE A. and ERONEN I., 1991. The *in vitro* effect of six NSAID on the glycosaminoglycan metabolism of rabbit chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.* **9**, 369-374.

DINSMORE C. E., 1991. A history of regeneration research. Milestones in the evolution of a science. Cambridge: Cambridge University Press.

FUJII K., TAJIRI K., SAI S., TANAKA T. and MUROTA K., 1989. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on collagen biosynthesis of cultured chondrocytes. *Semin. Arthritis Rheu.*, **18**, 16-18.



GERAUDIE J., 1977. Initiation of the actinotrichial development of the early fin bud of the fish *Salmo*. *J. Morphol.*, **151**, 353-362.

GERAUDIE J. and SINGER M., 1985. Necessity of an adequate nerve supply for regeneration of the amputated pectoral fin in the teleost. *Fundulus*. *J. Exp. Zool.*, **234**, 367-374.

GERAUDIE J. and SINGER M., 1992. The fish fin regeneration. *Monogr. Dev. Bio.*, **23**, 62-72.

GLAZER P., 1993. The effect of naproxen and interleukin-1 on Proteoglycan catabolism and on neutral Metalloproteinase activity in normal articular cartilage *in vitro*. *J. Clinical Pharmacology*, **33**, 109-114.

GOSS R. J. and STAGG M. W., 1957. The regeneration of fins and fin rays in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, **136**, 487-508.

GRASSÉ P. P., 1958. Rayons des nageoires. In: *Traité de Zoologie*. Paris, Masson. V. 13 t1 p, 731-747.

KEMP N. E., PARK J. H., McWILLIAMS A., AUERBACH S. E. and BOZDECH M. J., 1968. Fine structure of lepidotrichia and actinotrichia in regenerating tailfins of teleosts. *Anat. Rec.*, **160**, 374.

KRUKENBERG C. F., 1885. Über die chemische Beschaffenheit der sog. Hornfäden von *Mustelus* und über die Zusammensetzung der Keratinosen Hollen um die Eier von *Scyllium stellate*. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.*, **6**, 286-96.

MARÍ-BEFFA M., MATEOS I., PALMQVIST P. and BECERRA J., 1996. Cell to cell interactions during teleosts fin regeneration. *Int. J. Dev. Biol.*, **1** (suppl), 179S – 180S.

MONTES G. S., BECERRA J., TOLEDO O. M. S., GORDILHO M. A. and JUNQUEIRA L. C. U., 1982. Fine structure and histochemistry of the tail fin ray in teleosts. *Histochemistry*, **75**, 363-376.

MUSCARÁ M. N., MCKNIGHT W., ASFAHA S. and WALLACE J., 2000. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *British Journal of Pharmacology*, **129**, 681-686.

RATCLIFFE A., AZZO W., SAED-NEJAD F., LANE N., ROSENWASSER M. and MOW V., 1993. In Vivo effects of naproxen on composition, proteoglycan metabolism, and matrix metalloproteinase activities in canine articular cartilage. *J. of Orthopaedic Research*, **11**, 163-171.

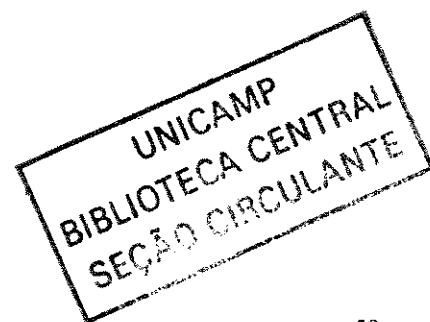
SANTAMARÍA J. A. and BECERRA J., 1991. Tail fin regeneration in teleosts: cell-extracellular matrix interaction in blastemal differentiation. *J. Anat.*, **176**, 9-21.

SANTAMARÍA J.A., MARÍ-BECCA M., SANTOS-RUIZ L. and BECERRA J., 1996. Incorporation of bromodeoxyuridine in regenerating fin tissue of the goldfish *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool.*, **275**, 300-307.

SANTOS-RUIZ L., SANTAMARÍA J. A., RUIZ-SÁNCHEZ J. and BECERRA J., 2002. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Developmental Dynamics*, **223**, 262-272.

SMITH R. L., KAJIYAMA G. and LANE N., 1995. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: effects on normal and interleukin 1 treated human articular chondrocyte metabolism *in vitro*. *The Journal of Rheumatology*, **22** (6), 1130-1137.

SRINIVAS G. R., CHICHESTER C., BARRACH H. and MATONEY A., 1994. Effects of certain antiarthritic agents on the synthesis of type II collagen and glycosaminoglycans in rat chondrosarcoma cultures. *Agents Actions*, **41**, 193-199.



## CONCLUSÃO

- O naproxeno, na dose utilizada neste trabalho (10,4mg/L), não afetou a organização dos componentes da matriz extracelular da lepidotriquia durante o processo regenerativo da nadadeira caudal;
- Os resultados apresentados fornecem uma base para que, no futuro, este modelo biológico da regeneração da nadadeira seja usado para se estudar, por exemplo, a organização espacial das fibrilas de colágeno e/ou a síntese de glicosaminoglicanos, utilizando-se doses maiores de naproxeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMENKO, M.; MARÍ-BECCA, M.; BECERRA, J.; GÉRAUDIE, J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. **Developmental Dynamics**, **226**, 190-201, 2003.

ARITA, G. S. A re-examination of the functional morphology of the soft-rays in teleosts. **Copeia**, **4**: 691-7, 1971.

ARUMUGHAM, R.; BOSE, S. M. Effect of indomethacin and naproxen on the metabolism of collagen in adjuvant-induced arthritis. **Scand. J. Rheumatology**, **10**: 161-167, 1981.

ARUMUGHAM, R.; BOSE, S. M. Effect of indomethacin and naproxen on the metabolism of glycosaminoglycans. **Scand. J. Rheumatology**, **11**: 225-229, 1982.

AZEVEDO, P.; FROTA-PESSOA, O. Peixe. Enciclopédia Mirador Internacional. Volume 16, 1981.

BAILEY, G.S.; HENDRICKS, J.D.; NIXON, J.E.; PAWLOWSKI, N.E. The sensitivity of rainbow trout and other fish to carcinogens. **Drug metabolism reviews**, **15**: 725-50, 1984.

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

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

BECHARA, I. J.; JOAZEIRO, P. P.; MARÍ-BEFFA, M.; BECERRA, J.; MONTES, G. S. Collagen-affecting drugs impair regeneration of teleost tail fins. **Submicroscopic Cytology and Pathology**, **32** (2), 2000.

BERTIN, L. Rayons des nageoires. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.). *Traité de Zoologie*. Paris: Masson. v.13, p.731-47, 1958.

BJELLE, A.; ERONEN, I. The *in vitro* effect of six NSAID on the glycosaminoglycan metabolism of rabbit chondrocytes. **Clin. Exp. Rheumatol.**, **9**: 369-374, 1991.

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

BLANC, M. Stude histologique de la régénération des nageoires chez quelques poissons téléostéens. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, **38**: 52-64, 1949.

BOUVET, J. Différenciation et ultrastructure du squelette distal de la nageoire pectorale chez la truite indigène (*Salmo trutta fario* L.). I. Différenciation et ultrastructure des lépidotriches. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, **63**: 63-79, 1974.

BUSER, J. & BLANC, M. Action de la lumière sur l'ostéogenèse réparatrice chez le poisson-chat. **Bull. Soc. Zool. France**, **74**: 170-2, 1949.

DAWE, T. S. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J.F.; FREI III, E.; eds. **Cancer Medicine**. 4ed. , Philadelphia, Lea & Feburger, 1982, p. 209-256.

FINGERMAN, S. W. Differences in the effect of fuel oil, and oil dispersant, and three polychlorinated biphenyls on fin regeneration in the gulf coast killifish, *Fundulus grandis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **23**: 230-40, 1980.

GARRAULT, M. Développement des fibres d'elastidine (Actinotrichia) chez les Salmonides. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, **32**: 105-37, 1936.

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

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

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

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

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

GLAZER, P. The effect of naproxen and interleukin-1 on Proteoglycan catabolism and on neutral Metalloproteinase activity in normal articular cartilage *in vitro*. **J. Clinical Pharmacology**, **33**: 109-114, 1993.

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

GOSS, R. J. & STAGG, M. W. The regeneration of fins and fin rays in *Fundulus heteroclitus*. **J. Exp. Zool.**, **136**: 487-508, 1957.

GRASSÉ, P. P. Rayons des nageoires. In: *Traité de Zoologie*. Paris, Masson. V. 13 t1 p. 731-47, 1958.



HARRISON, R. J. Über die Entwicklung der nicht knorpelig vorgebildeten skeletteile in den Flossen der Teleostier. **Arch. Mikrosk. Anat.**, **42**: 248-78, 1893.

HENDRICKS, J. D.; WALES, J. H.; SINNHUBER, R. O.; NIXON, J. E.; LOVELAND, P. M.; SCALAN, R. A. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) embryos: A sensitive animal model for experimental carcinogenesis. **Fed. Proc.**, **39**: 3222-9, 1980.

JOHNSON, S. L. & WESTON, J. A. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in zebrafish fin regeneration. **Genetics**, **141**: (4): 1583-1595, 1995.

KEMP, N. E. & PARK, J. H. Regeneration of lepidotrichia and actinotrichia in the tail fin of the teleost *Tilapia mossambica*. **Dev. Biol.**, **22**: 321-42, 1970.

KRUKENBERG, C. F. Über die chemische Beschaffenheit der sog. Hornfaden von *Mustelus* und über die Zusammensetzung der Keratinosen Hollen um die Eier von *Scyllium stellate*. **Mitt. Zool. Stat. Neapel.**, **6**: 286-96, 1885.

LANZING, W. J. R. The fine structure of fins and finrays of *Tilapia mossambica* (Peters). **Cell Tissue Res.**, **173**: 349-56, 1976.

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

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

MUSCARÁ, M. N.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; WALLACE, J. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. **British Journal of Pharmacology**, **129**: 681-686, 2000.

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

NECHIPORUK, A.; KEATING, M. T. A proliferation gradient between proximal and *msxb*-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. **Development**, **129**: 2607-2617, 2002.

ORR, R. T. *Biologia dos Vertebrados*. Editora Rocca, 1986.

PETERS, H. D.; DINNENDAHL, V. & SCHONHOFER, P. S. Mode of action of antirheumatic drugs on the cyclic 3'5'-AMP regulated glycosaminoglycan secretion in fibroblasts. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **283**: 29, 1975.

POSS, K.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK, A. Tales of Regeneration in Zebrafish. **Developmental Dynamics**, **226**: 202-210, 2003.

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

PRENANT, M. Régénération des rayons osseux (lépidotriches) articulés après amputation des nageoires chez des Téléostéens. **C. R. Soc. Biol. (Paris)**, **127**: 980-2, 1938.

RANG, H. P.; DALE, M. M. Farmacologia. Guanabara Koogan, 2-edição, 595pg, 1993.

RATCLIFFE, A; AZZO, W.; SAED-NEJAD, F.; LANE, N.; ROSENWASSER, M.; MOW, V. In Vivo effects of naproxen on composition, proteoglycan metabolism, and matrix metalloproteinase activities in canine articular cartilage. **J. of Orthopaedic Research**, **11**: 163-171, 1993.

RILEY, G. P.; COX, M.; HAZLEMAN, B. L. Inhibition of tendon cell proliferation and matrix glycosaminoglycan synthesis by no-steroidal anti-inflammatory drugs in vitro. **Journal of Hand Surgery**, **26B:3**: 224-228, 2001.

SADOWSKI, T.; STEINMEYER, J. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, **9**: 407-415, 2001.

SANTAMARÍA, J. A.; BECERRA, J. Tail fin regeneration in teleosts: cell-extracellular matrix interaction in blastemal differentiation. **J. Anat.**, **176**: 9-21, 1991.

SANTAMARÍA, J. A.; MARÍ-BECCA, M.; BECERRA, J. Interactions of the lepidotrichial matrix components during tail fin regeneration in teleosts. **Differentiation**, **49**: 143-50, 1992.

SANTOS-RUIZ, L.; SANTAMARÍA, J. A.; RUIZ-SÁNCHEZ, J.; BECERRA, J. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. **Developmental Dynamics**, **223**: 262-272, 2002.

SMITH, R. L.; KAJIYAMA, G.; LANE, N. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: effects on normal and interleukin 1 treated human articular chondrocyte metabolism *in vitro*. **The Journal of Rheumatology**, **22**:6, 1130-1137, 1995.

SOLHEIM, L. F.; RÖNNINGEN, H.; LANGELAND, N. Effects of acetylsalicylic acid and naproxen on the synthesis and mineralization of collagen in the rat femur. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, **105**: 1-4, 1986.

SRINIVAS, G. R.; CHICHESTER, C.; BARRACH, H.; MATONEY, A. Effects of certain antiarthritic agents on the synthesis of type II collagen and glycosaminoglycans in rat chondrosarcoma cultures. **Agents Actions**, **41**: 193-199, 1994.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebra-fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, **291**: 293-6, 1981.

THORSSON, O.; RANTANEN, J.; HURME, T.; KALIMO, H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. **The American Journal of Sports Medicine**, Vol. 26, N° 2, 1998.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, **231**: 232-235, 1971.

WEIS, P. & WEIS, J. S. Effect of zinc on fin regeneration in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*, and its interaction with methylmercury. **Fish Bull.**, **78**: 163-6, 1980.

WOOD, A. Early pectoral fin development and morphogenesis of the apical ectodermal ridge in the killifish *Aphyosemion sheelli*. **Anat. Rec.**, **204**: 349-356, 1982.

WOOD, A. & THOROGOOD, P. An analysis of in vitro cell migration during teleost fin morphogenesis. **J. Cell Sci.**, **66**: 205-222, 1984.

WOYNAROVICH, E. Manual de Piscicultura. CODEVASF- Irrigação. 2-edição, Brasília, 1988.