

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Flavia Fontenelle Muylaert

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIALÉRGICA E TOXICIDADE DA PELE DE
ESPÉCIES DE PEIXES-PORCO EMPREGADOS NA MEDICINA TRADICIONAL
BRASILEIRA POR POPULAÇÕES CAIÇARAS**

Rio de Janeiro

2018

Flavia Fontenelle Muylaert

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIALÉRGICA E TOXICIDADE DA PELE DE
ESPÉCIES DE PEIXES-PORCO EMPREGADOS NA MEDICINA TRADICIONAL
BRASILEIRA POR POPULAÇÕES CAIÇARAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Vigilância Sanitária.

Orientador: Dr. Fábio Coelho Amendoeira
Co-orientador: Dr. Fausto Klabund Ferrais

Rio de Janeiro

2018

Catologação na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Muylaert, Flavia Fontenelle.

Avaliação da atividade antialérgica e toxicidade da pele de espécies de peixes-porco empregados na medicina tradicional brasileira por populações caiçaras./Flavia Fontenelle Muylaert. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

114f.: il., graf., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientador: Dr. Fábio Coelho Amendoeira.

Coorientador: Fausto Klabund Ferrais.

1. Peixe-Porco. 2. Tetraodontiformes. 3. Asma. 4. Pneumonia. 5. Hipersensibilidade. 6. Toxicidade Aguda. I Título.

ANTI ALLERGIC ACTIVITY AND TOXICITY EVALUATION OF FILEFISH SKINS SPECIES USED BY FISHERMEN IN BRAZILIAN TRADITIONAL MEDICINE

Flavia Fontenelle Muylaert

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIALÉRGICA E TOXICIDADE DA PELE DE
ESPÉCIES DE PEIXES-PORCO EMPREGADOS NA MEDICINA TRADICIONAL
BRASILEIRA POR POPULAÇÕES CAIÇARAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira - Presidente
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/ FIOCRUZ)

Dra. Nancy dos Santos Barbi - Membro Externo
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dra. Andrea Surrage Calheiros - 3º Membro
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

Orientador: Dr Fábio Coelho Amendoeira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Orientador: Dr Fausto Klabund Ferraris
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Dedico este trabalho aos meus pais e a meu
marido, que me incentivaram nesta jornada.
Vocês são o meu alicerce, são minha razão de
viver.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sua presença em meu coração no meu dia a dia e por sua proteção;

Ao meu marido Pedro Henrique Bussinger de Carvalho pelo amor incondicional, por doar-se sem limites, por compartilhar vitórias e suportar as dores ao longo do meu doutoramento, amo-te mais que tudo e você sempre será o maior e o melhor acerto da minha vida;

Agradeço infinitamente aos meus pais Raul da Silva Muylaert e Flávia Maria Fontenelle Muylaert, pois sem eles não sou nada, são o meu amor maior, me suportam, acompanham e incentivam, me fazem buscar ser melhor a cada dia;

Agradeço ao meu sogro Marcelo Fontoura de Carvalho por sua personalidade viva e genuína e por sua colaboração incalculável, sem a qual este trabalho não seria possível;

Aos meus orientadores Dr. Fabio Coelho Amendoeira e Dr. Fausto Klabund Ferraris por suas muitas colaborações em bancada, pelas conversas e ensinamentos do dia a dia e lições aprendidas;

À Dra. Raquel Elisa da Silva López pela colaboração esmerada e por toda a ajuda durante todo o período que trabalhamos juntas;

Agradeço aos meus irmãos Raul Fontenelle Muylaert e Hayrthon Fontenelle Muylaert por sua presença mais que especial, por estar perto, mesmo estando longe, por me mostrarem que tenho com quem contar;

Às cunhadas Ana Paula Gonçalves Muylaert e Rita de Cássia Paula pelas risadas e momentos de descontração;

Agradeço pela existência de duas preciosidades da vida, são partes do meu coração, meu sangue, minha honra, Guilhermina Drumond Fontenelle Muylaert e Victor Gonçalves Fontenelle Muylaert;

À minha sogra Betânia Elisa Rocha Bussinger e minha cunhada Rebbeca Bussinger de Carvalho pelas palavras amigas e por todo o incentivo;

À amiga que ganhei nesta jornada, Nathalia Ferreira Vinagre, por suas importantes contribuições e por me ajudar esmeradamente, sua ajuda foi fundamental;

Aos amigos que levo em meu coração Renata Jurema Medeiros, Marcio Cipitelli e Rayane Natashe;

Aos companheiros de laboratório, exército de experimentos e amigos Esdras Barbosa Garcia, Amanda da Silva Chaves, Thaís Morais de Britto, Laís Higino D'oro e Naína Monsorez Félix, que tornaram essa jornada mais leve e muito mais divertida;

À atenciosa e prestativa equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais (FIOCRUZ/ Farmanguinhos) especialmente à Erika Teixeira e Thayane Alves pelo carinho, cuidado e bom humor durante o trabalho;

À equipe do Serviço de Animais de Laboratório (SAL), em especial ao Sr. Reginaldo, Thaís Veronez, à Jussara Bravin e a Marcos Aurélio Muniz, pela disponibilidade e solicitude de sempre;

Aos companheiros dos laboratórios de Toxicologia, Irritação Pirogênio e LAL, Fisiologia e ao Banco de células, em especial à Renata Calil, Taline Conde, D^a. Claudete (*in memoriam*), Nelson Pedreira, Fernando Fíngola; Tiago Savignon, Magno Maciele Thaís Su pela atenção, colaboração e parceria no dia a dia;

Ao laboratório de Farmacologia Aplicada (FIOCRUZ/ Farmanguinhos) principalmente aos Dr. Tadeu Costa e Dra. Tatiana Pádua por cada ajuda prestada, pelo companheirismo e pela parceria em todos os momentos;

A equipe da coordenação da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, por toda o carinho, paciência e dedicação;

Ao Dr Fábio Amendoeira pelo apoio financeiro e incentivo;

Ao suporte financeiro da CAPES ao longo destes 4 anos;

À Dra Alícia, por prontamente aceitar a revisão deste trabalho e por compartilhar sua construção;

E finalmente agradeço aos membros da banca por aceitarem participar da avaliação e por suas contribuições imprescindíveis.

MUITÍSSIMO OBRIGADA!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Na sociedade moderna, o uso de animais na medicina tradicional destaca-se como uma importante alternativa entre terapias mundialmente praticadas e tem despertado o interesse da comunidade científica. Atualmente, das 252 substâncias químicas essenciais selecionadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente, 10% são de origem animal. Embora esses usos sejam amplamente disseminados em algumas regiões do Brasil, esse tema tem sido pouco estudado quando comparado às plantas medicinais. No intuito de agregar conhecimento científico à cultura popular, confirmar ação terapêutica e investigar sobre a segurança do uso de peixes para fins medicinais, principalmente os provenientes das regiões costeiras do Brasil, o presente trabalho avaliou a toxicidade e a atividade moduladora da resposta inflamatória alérgica do pulverizado da pele dos peixes *Aluterus monoceros* (AM) e *Stephanolepis hispidus* (SH), tetraodontiformes da família *Monacanthidae*, popularmente conhecidos como peixes-porco, aos quais as populações pesqueiras atribuem propriedades farmacológicas amenizadoras dos sintomas da asma. A atividade biológica dos pulverizados foi avaliada por meio de modelos experimentais *in vivo* de pleurisia alérgica e no modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica em camundongos da linhagem BALB/ c. Os resultados mostraram uma contenção do infiltrado de leucócitos totais em torno de 40% com redução eosinofílica em torno de 50% nos lavados pleurais e broncoalveolares. Houve, aditivamente, redução dos teores de CCL11 e CCL5 nos lavados pleurais e depleção em torno de 45% de eosinófilos presentes no sangue periférico dos animais do modelo de inflamação pulmonar, sugerindo ação sobre esse grupo celular. Por meio do modelo de edema de pata, verificou-se atividade inibidora de até 67% de mediadores solúveis como a histamina. Na tentativa de elucidar algum mecanismo de ação, foi feita a hidrólise enzimática com papaína. Os pulverizados e produtos obtidos da reação enzimática foram utilizados *in vitro*, em cultura de macrófagos murinos J774-A1 e em linhagem basofílica RBL-2H3, mostrando potencial redutor da produção de óxido nítrico (NO) em linhagem de macrófagos. A toxicidade da ingestão das peles dos peixes-porco foi avaliada por meio do protocolo da OECD 420 e o acompanhamento dos animais que ingeriram o pó das peles dos peixes AM e SH não mostrou indícios de toxicidade. Diante desses resultados, podemos estimar atividade anti-inflamatória decorrente do uso da pele de peixes-porco, no entanto, mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na atividade deste produto.

Palavras-chave: Peixe-Porco. Asma. Inflamação Pulmonar Alérgica. Toxicidade Oral Aguda.

ABSTRACT

In modern society, traditional medicine with animals appears as an important alternative among therapies worldwide and stimulates the scientific community interest. Currently, of the 252 essential chemicals selected by the World Health Organization, about 10% are made with animals. Although traditional medicine with animals is widely disseminated in some regions of Brazil, this theme has been less studied than medicinal plants. In order to add scientific knowledge to popular culture, to confirm therapeutic action and to investigate the safety of the fish's use for medicinal purposes, especially those from coastal regions of Brazil, this study evaluated the toxicity and the modulatory activity on allergic inflammatory response of the skin powders from fishes *Aluterus monoceros* (AM) and *Stephanolepis hispidus* (SH), filefishes from *Monacanthidae* family, popularly known as planehead filefish and leatherjacket filefish, which the fishing people attribute pharmacological properties mitigating asthma symptoms. The powders biological activity was to evaluate through experimental models *in vivo* of allergic pleurisy and allergic lung inflammation with Balb/ c mice. Our results show the restriction of total leucocytes infiltration among 40% with eosinophilic reduction among 50% in pleural and bronchoalveolar washes. There was, in addition, a reduction of CCL11 and CCL5 content in pleural washes, and there was eosinophil depletion around 45% in peripheral blood of lung inflammation model, suggesting an action over this cellular group. By paw edema model was verified the inhibitory effect up to 67% of soluble mediators like histamine. Trying to elucidate possible action mechanisms, an enzymatic hydrolysis with papain was made. The powder and products from hydrolysis were evaluate *in vitro* in J774-A1 murine macrophages culture and in RBL-2H3 basophilic lineage culture, showing reduction power of nitric oxide (NO) production in macrophage lineage. The toxicity to filefish's skins was evaluated through OECD 420 oral acute toxicity protocol and the accompaniment of animals those receive AM and SH skins powders, didn't show any signs of toxicity. Considering these results, we can estimate an anti-inflammatory effect due the use of filefish's skins however, more studies are necessary to understand the action mechanisms involved on the activity of this product.

Keywords: Filefish. Asthma. Allergic Lung Inflammation. Acute Oral Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Balistes capriscus</i>	31
Figura 2 <i>Aluterus monoceros</i>	32
Figura 3 <i>Stephanolepis hispidus</i>	33
Figura 4 Biossíntese do colágeno	36
Figura 5 Agregado de proteoglicano de matriz extracelular	38
Figura 6 Representação da resposta asmática	43
Figura 7 Obtenção do hidrolisado proteico da pele dos peixes AM e SH	51
Figura 8 Protocolo do teste de toxicidade oral aguda	54
Figura 9 Protocolo de pleurisia alérgica	55
Figura 10 Protocolo de Inflamação pulmonar alérgica	56
Figura 11 Efeito de diferentes doses da pele do peixe <i>A.monoceros</i> no modelo de pleurisia alérgica induzida por ovalbumina	65
Figura 12 Efeito de diferentes doses da pele do peixe <i>S. hispidus</i> no modelo de pleurisia alérgica induzida por ovalbumina	66
Figura 13 Efeito do tratamento oral com as peles de peixe-porco dos peixes AM e SH no na quantidade de proteínas totais e na produção de IL-5, CCL11 (Eotaxina-1), e CCL5 (RANTES) nos lavado pleurais de animais desafiados com OVA	68
Figura 14 Efeito do tratamento com 500 mg/kg (v.o.) da pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i> sobre o infiltrado inflamatório no lavado broncoalveolar	69
Figura 15 Efeito do tratamento com 500 mg/kg da pele dos peixes sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em câmara de Neubauer	70
Figura 16 Efeito do tratamento com a pele dos peixes sobre o edema de pata induzido por ovalbumina	72
Figura 17 Efeito do tratamento com a pele dos peixes sobre o edema de pata induzido por histamina	73
Figura 18 Efeito do tratamento com a pele dos peixes sobre as populações de linfócitos T CD3 ⁺ e linfócitos T ativados CD3 ⁺ /CD25 ⁺ em linfonodos 72 h após edema de pata induzido por ovalbumina	74

- Figura 19 Efeito do pré-tratamento (1h antes) com diferentes concentrações do pó das peles e dos produtos da hidrólise de *A. monoceros* e *S. hispidus* sobre a degranulação da linhagem basofílica RBL-2H3 induzida por DNP-BSA por 24h à 37° C, 5% CO₂ 76
- Figura 20 Efeito do tratamento com diferentes concentrações da suspensão da pele e dos produtos da hidrólise da pele dos peixes na produção de óxido nítrico em macrófagos murinos da linhagem J774A.1 78
- Figura 21 Progresso do peso dos animais durante 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* 82
- Figura 22 Separação das proteínas utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%), corado com azul de comassie. Avaliação do perfil protéico unidimensional das peles de ambos os peixes porco nas condições com ou sem agente redutor (desnaturante) β-mercaptoetanol 87
- Figura 23 Separação das proteínas dos produtos da hidrólise com Papaína (20U/g) utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE -15%), corado com azul de comassie 88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Abordagem geral para o manejo das manifestações clínicas na asma	47
Quadro 2 Efeito da suspensão pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i> em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem murina J774.A1.	80
Quadro 3 Sinais clínicos em camundongos Balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i> .	81
Quadro 4 Ganho de peso 14 dias após administração de 2000 mg do pulverizado da pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i> .	82
Quadro 5 Ingestão alimentar total (g) por indivíduo, em camundongos Balb c, durante 14 dias	83
Quadro 6 Peso absoluto (g) e relativo ((g)/(g)PC) dos órgãos de camundongos balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i>	84
Quadro 7 Dados hematológicos dos camundongos Balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i>	85
Quadro 8 Dados bioquímicos dos camundongos Balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000 mg do pulverizado da pele dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i>	86
Quadro 9 Quantificação de proteínas dos pulverizados das peles dos peixes <i>A. monoceros</i> e <i>S. hispidus</i> e dos respectivos produtos de hidrólise com papaína	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ M	Micromolar
ALT	Alanino aminotransferase
AM	<i>Aluterus monoceros</i>
Anti - DNP	IgE específica anti-dinitrofenol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Do inglês: “protein activator 1” ou proteína ativadora-1
BAL	Do inglês: “bronchoalveolar lavage” - lavado broncoalveolar
BMAA	β -N-metil-amino-I-alanina
BSA	Albumina do soro bovino, do inglês bovine serum albumin
cav.	Cavidade
CCL11	Do inglês: “eotaxin 1/Chemokine (C-C motif) ligand 11” ou eotaxina 1- ligante 11 de quimiocina CC
CCL13/MCP-4	Do inglês: “monocyte chemotatic protein-4” ou proteína quimioatraente de monócitos
CCL5/RANTES	Do inglês: “regulated and normal T cell expressed and secreted” (regulada – normalmente expressa e secretada por células T)
CCL7/MCP-3	Do inglês: “monocyte chemotatic protein-3” ou proteína quimioatraente de monócitos
CCR3	Receptor para eotaxina 2
CD	Do inglês “cluster of Differentiation” (grupo de diferenciação)
CD106/VCAM-1	Do inglês: “vascular cellular adhesion molecule-1” ou molécula de adesão celular vascular
CD11a/LFA 1	Antígeno 1 associado a função leucocitária
CD11b/Mac-1	Do inglês “Macrophage integrin alpha M ($\alpha_M\beta_2$)” ou integrina alfa M
CD49d /VLA4	Do inglês: “very late antigen-4” ou integrina $\alpha_4\beta_1$ -molécula de adesão celular vascular
CD54/ICAM	Molécula de adesão intercelular
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
COX	Ciclooxigenase
CS	Do inglês “chondroitin sulphate” ou sulfato de condroitina
DEMEM	Do inglês: "Dulbecco's modified Eagle's medium" - meio de Eagle modificado de Dulbecco
DEXA	Dexametasona
DNA	Do inglês: “deoxyribonucleic acid” ou ácido desoxirribonucleico
DNP	Dinitrofenol
DS	Do inglês: “dermatan sulphate” ou sulfato de dermatan

ECP	Do inglês: “eosinophil cationic protein” ou proteína catiônica de eosinófilos
EDTA	Do inglês: “ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	Ensaio imunoenzimológico
ELISA	Do inglês: “enzyme linked immunosorbent assay” ou ensaio de imunoabsorção enzimática
FcεRI	Receptor de alta afinidade para a região constante carboxi terminal das moléculas de IgE
Fcγ	Região Fc de IgG
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Flk-1/KDR	Fator de crescimento endotelial VEGF/VEGFR-2
FSC	Do inglês: “Foward Scatter”
GAGs	Glicosaminoglicanos
GATA-1	Fator de transcrição humano GATA-1
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HaCaT	Do inglês: “human epidermal keratinocytes” - linhagem celular derivada de lesão primária de carcinoma epidermoide hipofaringe
HS	Heparan sulfato
HUVECs	Do ingles: "human umbilical vein endothelial cells" ou Linhagem endotelial venosa humana
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intrapleural
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
im.	Intramuscular
in.	Intranasal
iNOS	Do inglês: “induced nitric oxide synthase” ou Óxido nítrico sintase induzida
Ipl.	intraplantar
kD	Kilodalton
L-NAME	NG- nitro- L- arginina metil Ester
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTB4	Leucotrieno B4
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBP	Proteína básica principal
MDC	Quimiocina CCL22

MFAT	Fator nuclear de células T ativadas
MHC II	Complexo principal histocompatibilidade classe II
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase
MS	Ministério da Saúde
MT	Medicina Tradicional
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF- κ B	Do inglês: “nuclear factor kappa B” ou Fator nuclear κ B
NHEKs	Do inglês: "Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes" Cultura de células de queratinócitos humanos
nm	Nanômetro
NO	Do inglês: “nitric oxide” ou Óxido nítrico
NOS	Do inglês: “nitric oxide synthase” ou Óxido nítrico sintase
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
OMS	Organização Mundial da saúde
OPD	O-Fenilenodiamina
OVA	Ovalbumina
PAF	Do inglês: “platelet-activating factor” ou Fator de ativação plaquetária
PBMC	Do inglês: "peripheral blood mononuclear cell" ou células mononucleares do sangue periférico
PBS	Do inglês: “phosphate buffered saline” ou Tampão fosfato-salino
PDTIS	Programa de Desenvolvimento e Insumos para a Saúde
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostaglandina D2
PGE ₂	Prostaglandina E2
PLA2	Enzima citosólica fosfolipase A2
PN	Produtos naturais
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução da diretoria do colegiado
RNA	Do inglês: “ribonucleic acid” ou Ácido ribonucleico
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SDS	Detergente aniônico dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida contendo o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino

SH	<i>Stephanolepis hispidus</i>
SSD	Do inglês: Side Scatter
STAT1	Do inglês: “signal transducer and activator of transcription 1” (STAT1) ou Fator transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
TARC	Quimiocina CCL17
TCD4 ⁺ /Th	Do inglês T “helper” ou T auxiliar
TGFβ	Do inglês: “transforming growth factor beta” ou Fator de transformação do crescimento beta
TGO	Enzima aspartato-aminotransferase
TNF-α	Do inglês: “tumoral necrosis factor alpha” ou Fator de necrose tumoral-α
TSLP	Do inglês: "thymic stromal lymphopoietin" ou linfopoetina estromal tímica
TTX	Tetrodotoxina
v.o.	Via oral
VEGF	Do inglês: “vascular endothelium growth factor” ou Fator de crescimento do endotélio vascular
WHA	Do inglês: “World Health Assembly” - Assembléia Mundial de Saúde
β-hex	β-hexosaminidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1. Políticas nacionais e uso de produtos naturais (PN)	22
1.2. Riscos do uso de produtos naturais	244
1.3. Participação da fauna na medicina tradicional brasileira	25
1.4. Potencial terapêutico da fauna aquática	26
1.5. Ictiofauna brasileira na medicina tradicional	28
1.6. Os peixes-porco	30
1.7. Constituintes da pele de peixes ósseos	33
1.8. Algumas evidências científicas acerca das peles de peixes-porco	38
1.9. Panorama da asma	40
1.10. A patologia da asma	41
2 OBJETIVOS	48
2.1. Objetivos específicos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. Obtenção de materiais	50
3.1.1. Coleta e identificação	50
3.1.2. Obtenção do pulverizado da pele dos peixes	50
3.1.3. Obtenção do hidrolizado a partir do pó da pele dos peixes AM e SH.....	50
3.2. Animais	51
3.2.1. Toxicidade oral aguda decorrente da administração do pó da pele do peixe-porco	52
3.2.2. Pleurisia alérgica.....	54
3.2.3. Inflamação pulmonar alérgica.....	55
3.2.4. Edema de pata com ovalbumina	56
3.2.5. Edema de pata induzido por histamina	57
3.3. Processamento de amostras	57
3.3.1. Processamento dos lavados pleurais, broncoalveolares e sangue periférico	57
3.3.2. Contagem diferencial dos lavados pleurais, broncoalveolares e do sangue periférico dos animais utilizados nos modelos pleurisia e inflamação pulmonar alérgica	57
3.3.3. Análise de proteínas totais dos lavados	58
3.3.4. Quantificação dos mediadores inflamatórios.....	58
3.4. Análise de linfonodos dos animais do ensaio de edema de pata com ova	59

3.4.1. Preparo dos homogenatos dos linfonodos para avaliação das populações de linfócitos T e linfócitos T ativados para avaliação por citometria de fluxo.....	59
3.4.2. Avaliação do efeito da pele dos peixes porco sobre a população de células T ativadas por citometria de fluxo.....	60
3.5. Cultura de células	60
3.5.1. Ensaio de β -Hexoaminidase com linhagem basofílica RBL-2H3 <i>in vitro</i>	60
3.5.2. Avaliação da capacidade inibitória da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos murinos J774-A1 por meio do método de Griess <i>in vitro</i>	61
3.5.3. Viabilidade celular pelo método da resazurina (ALAMARBLUE [®])	62
3.6. Avaliação química preliminar	62
3.6.1. Quantificação proteica	62
3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) ..	63
3.7. Análise estatística	63
4 RESULTADOS	64
4.1. Pleurisia com ova	64
4.1.1. Curva dose resposta com a pele do peixe AM.....	64
4.1.2. Curva dose resposta com a pele do peixe SH	65
4.1.3. Dosagem de proteína pelo método de Bradford e de mediadores inflamatórios no lavado pleural	67
4.2. Inflamação pulmonar alérgica	64
4.2.1. Avaliação da celularidade nos lavados broncoalveolares	68
4.2.2. Leucometria total e diferencial do sangue dos animais utilizados no protocolo de inflamação pulmonar.....	70
4.3 Efeito antiedematogênico das peles dos peixes	71
4.3.1. Efeito do tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH sobre o edema de pata induzido por OVA.....	71
4.3.2. Efeito do tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH sobre o edema de pata induzido por histamina	72
4.3.3. Efeito do tratamento com o pulverizado da pele dos peixes sobre a ativação de célulasT	73
4.4. Ensaio <i>in vitro</i> com o pulverizado da pele dos peixes e seus produtos de hidrólise .	74
4.4.1. Avaliação dos efeitos da pele e dos produtos de hidrólise sobre a liberação de β -hexosaminidase (β -Hex) em linhagem basofílica RBL-2H3	74

4.4.2. Avaliação dos efeitos da pele e dos produtos de hidrólise sobre a produção de NO em macrófagos murinos J774-A1	77
4.4.3. Ensaio de citotoxicidade com as peles dos peixes AM e SH e os seus produtos de hidrólise com papaína	79
4.5. Avaliação de toxicidade oral aguda	80
4.5.1. Avaliação dos sinais clínicos	80
4.5.2. Avaliação de ganho de peso	80
4.5.3. Avaliação de ingestão alimentar	82
4.5.4. Avaliação peso absoluto e relativo de órgãos	83
4.5.5. Avaliação hematológica.....	84
4.5.6. Avaliação bioquímica.....	85
4.6. Avaliação preliminar do perfil químico da pele dos peixes AM e SH	86
4.6.1. Quantificação de proteínas totais.....	86
4.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) ..	87
.....	87
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

A expressão Medicina Tradicional (MT) denomina um conjunto de saberes, práticas e habilidades para finalidade de cura, recuperação, manutenção, promoção da saúde ou prevenção de doenças. São conhecimentos construídos com base em crenças, mitos, experiências ou teorias oriundas nas mais diversas culturas por todo o mundo. Estes conhecimentos são consequentes das relações de interação homem/natureza, incluem alimentos e uma extensa farmacopéia composta de derivados de plantas, raízes, cascas ou elementos de origem animal e mineral, conectando inevitavelmente a natureza ao que é salubre (LUZ, 2005; ROBINSON; ZHANG, 2011; WHO, 2013). Estas práticas inegavelmente conferiram proteção à existência humana, propagaram-se entre povos, persistiram através de gerações, aprimoraram-se ao longo do tempo. Como exemplo, a milenar cultura chinesa, atualmente reconhecida em âmbito global, há mais de 2500 anos evolui paralelamente a alopatia. Os vários focos de curandeirismos dispersos por todo o mundo, em suas várias formas, igualmente exibem a força da MT (LUZ, 2005; ROBINSON; ZHANG, 2011; DHAMI, 2013; WHO, 2013).

Segundo dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 70 até 95% das populações subdesenvolvidas ou em desenvolvimento, nas quais a desigualdade social é profunda (especialmente países da América Latina, Ásia e África), dependem do uso de plantas medicinais e produtos de origem natural para acesso aos cuidados básicos de saúde. Este quadro pode ser justificado por uma combinação de biodiversidade, fatores culturais herdados, adicionados à pressão sobre os segmentos menos favorecidos destas sociedades que sofrem em função da desnutrição e doenças infectocontagiosas relacionadas a condições sanitárias insuficientes, recorrendo a MT como recurso médico, por não ter acesso à assistência médica convencional (LUZ, 2005; ROBINSON; ZHANG, 2011; WHO, 2013).

Muitas espécies e preparados vegetais vem sendo estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento de substâncias bioativas que lhes conferem suas propriedades curativas. A ciência busca cada vez mais avanços na purificação destas substâncias, estratégias no isolamento dos seus princípios ativos e novas tecnologias, que encorajam cada vez mais a pesquisa farmacêutica no desenvolvimento de novos medicamentos. Na atualidade, a MT tornou-se equivalentemente relevante à medicina aloterápica, e pode-se dizer que, por volta de 50% das drogas existentes, são derivadas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; ALVES; ROSA, 2007b; DA

ROSA, 2012; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013; DHAMI, 2013). Apesar disso, há uma grande proporção da maioria dos biomas tropicais ainda por explorar, a bioprospecção de potenciais fontes de princípios ativos ou moléculas que possam originar novos fármacos se tornou o grande foco da pesquisa neste campo de conhecimento (DHAMI, 2013). Na literatura, um incremento das pesquisas neste setor é evidenciado, a exemplo da recente perspectiva de Albuquerque e colaboradores, publicada em 2013, que se refere ao “status” das pesquisas em etnobiologia na América Latina, na qual se verifica o crescente interesse científico pelos produtos naturais, sobretudo no México e no Brasil (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013). Neste momento, os campos de etnofarmacologia estão em evidência, sendo extremamente importante para a descoberta de novos fármacos (DHAMI, 2013).

1.1 Políticas nacionais e uso de produtos naturais (PN)

Apesar da existência dos produtos naturais e serviços médicos tradicionais por tantos séculos, a regulamentação do uso de produtos naturais ainda é bastante recente, tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Até o momento, os produtos naturais não são oficialmente reconhecidos em muitos países e a universalidade dos sistemas regulatórios para o uso destes ainda não ocorre, consistindo no principal desafio da atualidade.

Neste contexto, a estratégia de MT da OMS (2014-2023), elaborada em resposta à Assembléia Mundial de Saúde (WHA), teve como objetivo o estímulo de políticas pró-ativas para a instituição de planos de ação visando fortalecer a MT a nível global. A OMS vem nas últimas décadas estimulando os governos de seus estados membros a respeitar, preservar e comunicar amplamente os conhecimentos de MT. Entre os objetivos desta estratégia estão: a uniformização do conceito de MT pelos países membros, onde estas formas de medicação assumem a forma “complementar ou alternativa” díspara da maioria dependente destes recursos; e a aceitação destes usos, integrando a MT aos sistemas de saúde através programas nacionais e políticas que promovam o uso seguro e de qualidade da MT com base científica, por meio do estímulo à pesquisa e inovação, as quais fornecerão orientações para garantia de qualidade. Nesta sequência, a busca pela regulamentação destes produtos com base em normatizações, assim promovendo o uso universal adequado, seguro e eficaz da MT. Por meio destas políticas, visa-se o uso sustentável destes recursos garantindo acessibilidade e disponibilidade para populações mais pobres bem como o uso racional e adequado por profissionais e consumidores (ROBINSON; ZHANG, 2011; WHO, 2013).

Entre os países que atualmente trilham o caminho para a regulamentação dos produtos naturais estão o Brasil, China, Dinamarca, Gana, Japão, Noruega, República da Coreia e Arábia Saudita. A União Europeia, no momento, desenvolve métodos para regulação da qualidade dos medicamentos e dos mecanismos tradicionais para o registro destes produtos (ROBINSON; ZHANG, 2011).

No Brasil, desde 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), instituída pela portaria 971 do Ministério da Saúde (MS), objetiva integrar os recursos terapêuticos das medicinas tradicionais aos Sistemas Oficiais de Saúde. O intuito desta política foi compreender o pluralismo brasileiro em saúde, descentralizando as ações e participação popular e provendo maior autonomia aos Estados e Municípios na elaboração de suas políticas e ações em saúde, contribuindo com o crescimento de experiências pioneiras. Disponibilizaram-se os recursos de MT e plantas medicinais para atenção básica à saúde rendendo a confirmação das práticas populares em cada unidade e publicações para os profissionais envolvidos na certificação de segurança e eficácia destes produtos. A necessidade de ampliações das opções terapêuticas direcionou a criação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) que determinou a pesquisa do potencial terapêutico, objetivando principalmente a certificação das propriedades medicinais dos recursos naturais disponíveis, impactando no fortalecimento da agricultura e geração de empregos, reduzindo desigualdades, valorizando, reconhecendo e preservando o conhecimento tradicional e seus povos de origem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; DA ROSA, 2012). Entretanto, na PNPMF toda atenção e esforços estiveram voltados aos fitoterápicos, produtos naturais derivados de vegetais e ervas, enquanto produtos naturais de origem animal estiveram negligenciados (STILL, 2003; ALVES; ROSA, 2005; COOPER, 2008; ALVES *et al.*, 2011).

Na atualidade, os órgãos mais diretamente implicados na regularização de produtos de origem animal *in natura* são o MS e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As portarias MS/SVS nº 326/1997 e MAPA nº 368/1997, estabelecem normas de boas práticas de fabricação, bem como padronização de estabelecimentos produtores, procedimentos operacionais e as condições para a garantia de qualidade no controle de condições higiênico-sanitárias de manipuladores e produtos com finalidades alimentícias (CARRAZZA *et al.*, 2011). No entanto, para alimentos de origem animal, ainda não é previsto o uso como alternativa ou auxiliar terapêutica e tão pouco há a consideração de presença de substâncias bioativas.

1.2 Riscos do uso de produtos naturais

É cada vez mais frequente o uso de produtos naturais desconhecidos, comercializados com o apelo da propaganda, sob a promessa de benefícios seguros em função de sua origem 100% natural, assim desprezando os possíveis efeitos tóxicos, constituindo um sério problema de saúde pública. Vale ressaltar que em torno de 80% dos medicamentos alopáticos são derivados ou moléculas inspiradas em compostos naturais, que são metabolizados pelas mesmas vias dos fármacos alopáticos convencionais (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Eventos de toxicidade de produtos naturais de origem animal podem ser decorrentes da exposição ao fenômeno de magnificação trófica, ou seja, devido à bioacumulação de toxinas ambientais, como os suplementos alimentares comercializados que utilizam a cartilagem de tubarão. A razão para esta bioacumulação está no fato de que tubarões são predadores expostos a estas toxinas ambientais por sua dieta. Ao realizar avaliação de produtos elaborados a partir da cartilagem de tubarão, foi possível a detecção da substância neurotóxica β -N-metil-amino-I-alanina (BMAA), em 15 dos 16 suplementos comerciais disponíveis. Esta substância está relacionada a doenças degenerativas cerebrais e o consumo do suplemento está ligado diretamente à doença. Quanto à exposição ao mercúrio, foi possível verificar baixas concentrações em todos os produtos analisados (MONDO *et al.*, 2014).

Intoxicações causadas pela ingestão de tetrodotoxina (TTX) devido ao consumo da carne de baiacu são eventos recorrentes de toxicidade. No Japão, esta carne é uma iguaria preparada apenas por cozinheiros especializados que procuram retirar a maior parte do veneno concentrado principalmente nas vísceras (gônadas, fígado e baço) e na pele do peixe. Neste preparo, poucos resíduos da toxina restam na carne do peixe, com a finalidade de provocar parestesias periorais e labiais durante a degustação. Apesar de todo o cuidado, cerca de 50 casos de envenenamento fatal são registrados a cada ano. No Brasil não há dados epidemiológicos destas ocorrências, entretanto relatos esparsos de intoxicações graves e óbitos são registrados. Mesmo com os registros relacionados ao uso como alimento, o 'fel', conteúdo do fígado que contém TTX, é utilizado como analgésico para dores de dente por Pescadores que pingam o 'fel' no local da dor e se expõem a envenenamentos potencialmente letais. Em algumas horas as manifestações neurológicas surgem: fraqueza muscular, mialgias, vertigens, com o agravamento chegam a convulsões, depressão respiratória e falência circulatória causando o óbito devido à paralisia muscular (COSTA-NETO; MARQUES, 2000; LIMA *et al.*, 2010).

Em adição, os produtos medicinais oriundos de animais podem acarretar prejuízos à saúde por não se encontrarem em condições sanitárias mínimas para uso. Más condições no preparo e conservação, da mesma forma podem acarretar diversos problemas à saúde. Estes produtos perecíveis podem ser estocados de maneira imprópria, sem controle de temperatura. Além disso, muitas infecções podem ser transmitidas por preparações com animais, principalmente nos casos nos quais são constituídas de matérias primas cruas. Ressalta-se que vários fatores contribuem para a suscetibilidade dos produtos oriundos de peixes ao processo de deterioração, o pH perto da neutralidade, alto teor de água nos tecidos, alta concentração de lipídios poliinsaturados, elevada concentração de nutrientes e alta atividade da microbiota existente nos tecidos, ação autolítica de enzimas presentes no tecido (ALVES; ROSA, 2006; RAMIRES *et al.*, 2012). Existem também possibilidades de alergias ou toxicidade, bem como interações entre substâncias presentes nestes produtos e fármacos aloterápicos, assim contribuindo com o agravamento do quadro do paciente ou ainda provocando danos (COSTA-NETO; MOTTA, 2010; COSTA NETO, 2011).

1.3 Participação da fauna na medicina tradicional brasileira

O uso de medicamentos elaborados a partir de tecidos de origem animal, pele, glândulas, ossos, chifres, dentes, secreções, bile ou ainda, excrementos, recebe o nome de zooterapia (ALVES; ROSA, 2005). Dentre as suas práticas, a organoterapia denomina a ingestão de órgãos para tratamento de doenças e a opoterapia, que designa o emprego de extratos obtidos de animais ou de seus órgãos sob a forma de chás ou sucos por vias oral, subcutânea, endovenosa ou intraperitoneal também para fins terapêuticos ou profiláticos (CHEMAS, 2010).

A zooterapia, em seus diversos formatos, é definida principalmente por influências culturais referentes às regiões de origem, pode-se dizer que a zooterapia é ubíqua, conforme Marquesem sua Hipótese da Universalidade (1994), segundo a qual toda sociedade humana apresenta seu sistema médico tradicional composto em parte de produtos naturais derivados de animais (COOPER, 2008; SOUTO *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012).

Na medicina tradicional chinesa, por exemplo, desde os tempos remotos, mais de 1500 espécies são utilizadas para fins medicinais e pelo menos 13% dos medicamentos utilizados são derivados de animais (STILL, 2003). Na América Latina, em uma revisão da literatura de 2011, constatou-se o uso de 584 espécies animais distribuídas em 13 grupos taxonômicos distintos (ALVES; ALVES, 2011). Em 2013, foi descrito em trabalho publicado por Rômulo

R. N. Alves, o uso de pelo menos 354 espécies animais utilizadas em recursos terapêuticos dos quais 157 também são usados como alimento (ALVES; OLIVEIRA; ROSA, 2013).

A diversidade cultural brasileira herdada do período colonial é composta por influências indígenas nativas, colonial européia e africana consequente da escravatura o que permitiu um amplo espectro de possibilidades e uma complexidade de aproveitamentos dos recursos da flora e fauna como potenciais terapias. O território brasileiro provê aproximadamente 20% da biodiversidade global, diretamente em contato com uma gama étnica formada de pelo menos 200 grupos indígenas diferenciados que detêm aprofundado e extenso conhecimento das características ambientais e possibilidades de manejo dos recursos faunísticos nos territórios que ocupam. Há da mesma forma, um enorme número de comunidades não indígenas, decorrentes do modelo de ocupação do espaço brasileiro, devido ao avanço irregular da sociedade nacional para o interior do país, que, em razão de poucos recursos, difícil acesso ou isolamento geográfico, tem a necessidade de recorrer à natureza para o tratamento de doenças (DIEGUES *et al.*, 1999; ALVES; OLIVEIRA; ROSA, 2013). O interesse sobre os remédios derivados de animais também se estende aos centros urbanos devido a carência por serviços de assistência médica ou mesmo por necessidade de suplementação do atendimento à saúde disponível (ALVES *et al.*, 2011; ALVES; OLIVEIRA; ROSA, 2013).

1.4 Potencial terapêutico da fauna aquática

É sabido que os mares ocupam mais de 2/3 da superfície do planeta, correspondendo a 70% da superfície terrestre, abriga organismos da maioria dos filos descritos na atualidade (JOLY; VERDADE; BERLINCK, 2011). Ecossistemas marinhos proporcionam um potencial biotecnológico aparentemente ilimitado, e são alvos das pesquisas desde a década de 70, em função da melhoria das tecnologias exploratórias. Os estudos dos produtos marinhos seguiram por 20 anos fornecendo uma enormidade de moléculas e estruturas químicas até então desconhecidas. Devido à infinidade de matérias primas que pode oferecer, o mar tem sido classificado como a maior fonte de moléculas e novos compostos a serem farmacologicamente avaliados (ANEIROS; GARATEIX, 2004; COOPER, 2004; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Entre os fármacos derivados de animais marinhos, a ziconotida é um poderoso analgésico derivado da toxina do caracol *Conus magus*. Este peptídeo bloqueador seletivo de canais de cálcio do tipo-N dependentes de voltagem impede a neurotransmissão,

interrompendo os sinais de dor ao nível da medula espinhal. A ziconotida, produzida e comercializada com o nome Prialt[®], foi aprovada para o tratamento de dor severa e crônica quando administrada por via intratecal para pacientes refratários ao tratamento com morfina ou quando a via intratecal é a melhor opção, a “infusão intratecal de ziconotida”, é comercializada pela empresa Elan Pharmaceuticals (MCGIVERN, 2007; MARTINS *et al.*, 2014).

No arsenal terapêutico dos peixes, muitos compostos extraídos foram empregados em remédios na medicina oficial, como exemplo, a TTX, extraída do Baiacu (*Colomesus sp.*) e do Baiacu-pintado (*Sphoeroides testudineus*), um composto bioativo solúvel em água, derivado da guanidina e similar à procaína, que tem a propriedade de inibir a transmissão sináptica agindo como um analgésico poderoso e ainda um excelente narcótico. Em seu uso medicinal, os pescadores utilizam o veneno para o tratamento da dor de dente, pingando-o no local da dor (COSTA-NETO; MARQUES, 2000; ANDRADE; NETO, 2005; COSTA-NETO, 2005; EL-DEIR *et al.*, 2012). Esta potente neurotoxina inibe o potencial de ação pelo bloqueio dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem em neurônios afetados (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). No Japão, utiliza-se a tetrodotoxina para tratamento de dor em pacientes de câncer e neuropatias ocasionadas por hanseníase (ANDRADE; NETO, 2005). Este produto encontra-se em ensaios clínicos de fase II e III pela companhia WEX Pharmaceuticals, no Canadá, para fins de desenvolvimento do fármaco Tectin[®], destinado ao controle da dor neuropática periférica induzida pela quimioterapia em pacientes sob tratamento (NEWMAN; CRAGG, 2014).

Podemos também mencionar o *Eptatretus stoutii* (peixe-bruxa) e a *Dasyatis Sabina* (arraia rabo-de-chicote), fontes de estimulantes cardíacos e drogas antitumorais respectivamente, hoje incorporados à medicina oficial (COSTA-NETO; MARQUES, 2000; COSTA NETO; ANDRADE, 2005; COSTA-NETO, 2005; ALVES *et al.*, 2011).

Em 1990 foi descoberta uma nova substância em tubarões-prego (*Squalus acanthias* Linnaeus 1758), a esqualamina, um aminoesteróide catiônico que exibe potente atividade antimicrobiana. Esta substância, isolada inicialmente do estômago destes peixes, é capaz de promover a lise osmótica de protozoários; também apresenta capacidade fungicida e antibacteriana de amplo espectro mostrando um potencial antibiótico equivalente a ampicilina (MOORE *et al.*, 1993; COSTA-NETO, 2005; ZASLOFF *et al.*, 2011). Mais tarde foi possível mostrar a atividade antiviral da esqualamina, o mecanismo que envolve a capacidade de neutralização da superfície interna (aniônica) da membrana celular interrompendo o ciclo de replicação viral. Em adição, o avanço dos estudos sobre esta substância trouxe evidências de

atividade antiangiogênica e bloqueadora da multiplicação celular sugerindo ação antitumoral, entretanto mais investimentos são necessários para o progresso destas pesquisas (ZASLOFF *et al.*, 2011).

Tubarões também foram fonte de suplementos a base de sua cartilagem que oferece benefícios contra o câncer e em condições inflamatórias, como a artrite reumatóide, psoríase, entre outras patologias dependentes da angiogênese. Várias preparações derivadas da cartilagem de tubarão de fato apresentaram efeitos inibitórios sobre a angiogênese e sobre a atividade da collagenase. O Neovastat (Æ-941), derivado da cartilagem dos tubarões-prego, foi um preparado capaz de interferir no mecanismo de angiogênese via bloqueio da sinalização pelo fator de crescimento endotelial VEGF/VEGFR-2 (Flk-1/KDR) requeridos para a formação de novos vasos sanguíneos. O Neovastat também inibiu a ação de enzimas proteolíticas como as metaloproteases limitando o potencial metastático das células tumorais. Estes estudos confirmaram a hipótese de que a ativação de células endoteliais, levando a um aumento da proliferação celular e a elevação das metaloproteases são eventos cruciais para o desenvolvimento de tumores. Entretanto, diferenças entre os mecanismos de absorção, diferenças entre metabolismos de humanos e animais experimentais e a dificuldade em se trabalhar com uma preparação de maior complexidade, e não uma substância isolada foram fatores determinantes para a controvérsia que trouxe ceticismo aos efeitos da cartilagem de tubarão (GONZÁLEZ; LEYVA; MORAES, 2001; PATRA; SANDELL, 2012).

1.5 Ictiofauna brasileira na medicina tradicional

Considerando o histórico da ocupação brasileira em sua vasta extensão costeira de aproximadamente 8.500km, seus territórios abastecidos por 5,5 milhões de hectares de água doce, em torno de 12% da água doce superficial do planeta, mão de obra barata e clima favorável, o Brasil apresenta condições altamente favoráveis para a atividade pesqueira (DIEGUES, 2006; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014). De fato, esta atividade tornou-se primordial na vida de muitas comunidades de pescadores artesanais e populações caiçaras que exploram a biodiversidade aquática para obtenção de sua principal fonte de renda. Estas populações se utilizam da mão de obra familiar para o exercício da pesca explorando continuamente os ambientes costeiros, acumulando conhecimento a cerca de biologia e manejo dos recursos aquáticos das regiões onde vivem, assim transmitindo aos jovens os seus conhecimentos sobre estas atividades e consolidando essas práticas (PAZ; BEGOSSI, 1996a; DIEGUES *et al.*, 1999; CLAUZET; RAMIRES; BARRELLA, 2005; EL-

DEIR *et al.*, 2012). Em levantamento de 2012, realizado por Ana Carla A. El-Deir e colaboradores, foi demonstrado que as práticas zoterápicas envolvendo a ictiofauna estão disseminadas por pelo menos 14 estados brasileiros dentre os quais estão: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte o que evidencia a intensidade destas práticas por populações nordestinas. Neste trabalho encontrou-se um repertório de 85 espécies de peixes utilizadas em medicina tradicional, entre as quais 44 são predominantemente de água doce e 41 espécies são de água salobra (EL-DEIR *et al.*, 2012). Para estas comunidades, a ictiofauna provê não só seu alimento, mas sim, fonte barata e rica em proteína que contém todos os aminoácidos essenciais, de alta digestibilidade, com nutrientes como: ácidos graxos poliinsaturados (ômega 3, 6 e 9), vitaminas e minerais; mas também, estabelece importante valor terapêutico e de cura para os que se utilizam destes recursos (EL-DEIR *et al.*, 2012). Diversos autores constataam que o emprego de matéria prima da pesca como recurso medicinal representa em torno de 12% a 30% do arsenal de produtos naturais derivados de animais, no Brasil, para tratamento de diversas enfermidades (ALVES; ROSA, 2006, 2007; SILVA, 2008; ALVES, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009; ALVES; ALVES, 2011; ALVES; OLIVEIRA; ROSA, 2013). Em algumas comunidades litorâneas este percentual chega a atingir 62%, evidenciando a importância da etnoictiologia na medicina popular brasileira (COSTA-NETO; MARQUES, 2000). Entre as matérias primas empregadas para fins terapêuticos estão a carne, peles; escamas; muco ou secreções (bile), órgãos como fígado, estômago, a cartilagem, esporões, dentes, olhos, cauda, entre outras partes e finalmente; muitas vezes o peixe inteiro é utilizado como medicamento. Os preparos são os mais diversos, como exemplo: a gordura pode ser utilizada crua, diretamente sobre os locais afetados em massagens ou fricções ou frita (derretida), para aplicar ou pingar, de uso tópico, ou adicionada à bebidas (muitas vezes alcoólicas) ou em chás. Entre outros usos registrados, elementos como peles e esporões podem ser utilizados, secos ao sol, torrados e moídos em chás, bebidas ou ainda salpicados sobre a refeição, ou como amuletos, ossos podem ser triturados para infusões ou utilizados em defumações. Ou ainda estes produtos podem ser associados a outros produtos naturais como ervas ou plantas constituindo as ditas “garrafadas” (SILVA, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). Em muitos casos pode tratar-se do ‘efeito placebo’, no entanto, muitas vezes, estas práticas consistem em usos pertinentes, que devem ser investigados e enfatizados. São culturas que podem nos orientar na direção de evidências de compostos bioativos, um possível foco para o interesse da ciência. É necessário averiguar a persistência destes usos empíricos que potencialmente representam um “atalho” para a

descoberta de novos fármacos na medicina moderna. O valor terapêutico destas substâncias não deve ser subestimado apesar da falta do apoio formal da ciência.

1.6 Os peixes-porco

Os “peixes-porco” são assim chamados por emitirem “roncos”, oriundos de suas bexigas natatórias, que remetem ao grunhido do mamífero, no momento em que são retirados da água. Estão no grupo de vertebrados aquáticos com mais de 23.600 mil espécies em todos os ambientes. São peixes ósseos (Osteichthyes), da classe actinopterygii, ou actinopterígeos, pois possuem nadadeiras sustentadas por raios dérmicos internos (FISCHER; PEREIRA; VIEIRA, 2011). Pertencem à ordem Tetraodontiforme, famílias *Monacantidae* e *Balistidae*, as quais incluem em torno de 102 espécies em 32 gêneros (NELSON, 2006).

Os peixes-porco do gênero *Balistidae* também apelidados de peroá, porquinho ou cângulo, compreendem, no Brasil, as espécies *B. capriscuse* e *B. vetula*, de corpo alto, fusiforme e lateralmente comprimido, com pouco mais de 40 cm de comprimento, chegando a 60 cm. Em sua boca pequena e posicionada aproximadamente terminal, possui oito dentes do tipo incisivo nas séries externas da maxila e mandíbula. As aberturas branquiais são reduzidas e posicionadas acima das nadadeiras peitorais. Suas nadadeiras peitorais são rudimentares, com raios paralelos em forma de leque, como nos actinopterygii. Apresentam duas nadadeiras dorsais, a primeira com três espinhos, com mecanismo de bloqueio, podendo permanecer ereto. Devido a este mecanismo, que utilizam como proteção quando ameaçados, ou para fixar-se entre fissuras dos corais ou rochas, recebem, muitas vezes o apelido de ‘gatilho’. Sua segunda nadadeira dorsal e sua nadadeira anal apresentam-se opostas e sua nadadeira caudal emarginada, com raios externos prolongados. A coloração de suas peles é variável podendo ser acinzentada, enegrecida ou parda ou ainda podem ter marcas e padrões de cores muito vivas. São geralmente solitários ou nadam em pequenos grupos. Ocorrem em águas tropicais e temperadas do oceano Atlântico e são encontrados até de 100 metros de profundidade e distribuindo-se em baías rasas, ao longo de praias, ilhas, águas pelágicas ou em torno de recifes rochosos e de coral. Alimentam-se em torno desses recifes, devorando principalmente moluscos, ouriços e invertebrados bentônicos. A captura é comercialmente com redes de arrasto de fundo, emalhe e cerco (SAMPAIO; NOTTINGHAM, 2007; FISCHER; PEREIRA; VIEIRA, 2011).

Figura 1 - *Balistes capriscus* (Gmelin,1789)



Fonte: (ICTIO.TERM, 1998). Sinonímias: Peixe-porco, Peroá, Cângulo ou Porquinho.

A família *Monacantidae*, possui muitas similaridades ao gênero *Balistidae*, de corpo alto e lateralmente comprimido, boca terminal apresentando seis dentes na série externa da maxila e seis, ou menos, na mandíbula, sua abertura branquial é diminuta, também posicionada sobre as nadadeiras peitorais em formato de leque, exatamente como nos membros da família *Balistidae*. Suas primeiras nadadeiras dorsais possuem apenas dois espinhos, o primeiro bem maior que o segundo, podendo ficar ereto devido a seu mecanismo de trancamento. Sua segunda nadadeira dorsal e a nadadeira anal são contrapostas, como nos *Balistes*. Possuem nadadeira pélvica rudimentar ou ausente e sua nadadeira caudal é arredondada ou truncada.

Entre os peixes da família *Monacantidae*, o *Aluterus monoceros* (Linnaeus,1758) é um peixe de corpo mais alongado, de comprimento normalmente em torno de 40 cm, chegando a medir em torno de 75 cm, por esse motivo, chamado de peroá chinelo. Sua pele, de coloração acinzentada, esverdeada, ou até amarronzada, porém de tonalidades mais claras mais uniformes, é responsável pela sinonímia de cângulo branco. Agrupam-se em pequenos cardumes e alimentam-se de invertebrados bentônicos, esponjas, algas, moluscos e ouriços. Vivem em torno de 80 a 100 m de profundidade em águas tropicais e subtropicais do atlântico, ocorrendo em todos os oceanos. Estes, como os *Balistes*, são encontrados tanto em mar aberto, quanto próximos a costões rochosos e recifes de corais sobre fundos rochosos ou arenosos, sendo mais abundantes na costa do sudeste e sul do Brasil. Por esse motivo, são capturados em redes de arrasto de fundo, emalhe ou cerco.

O *B. capriscus* e o *A. monoceros* são aparentemente os peixes-porco de maior importância comercial no Brasil, principalmente entre os pescadores do litoral dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, que os exploram como recurso econômico. O quilograma de sua carne chega a valer R\$20,00 em peixarias sendo consumidos como petiscos em boa parte das praias do litoral brasileiro. Considerados uma iguaria, quase em unanimidade na culinária, pois o sabor de sua carne é muito apreciado. Segundo o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, juntas, estas espécies produzem uma pesca média aproximada de 5300 toneladas de pescado ao ano (VIANNA *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2011).

Figura 2 - *Aluterus monoceros* (Linnaeus, 1758)



Fonte: (FISHBASE, 2013). Sinonímias: Peroá-chinelo ou Cângulo-branco.

Já o peixe *Stephanolepis hispidus* é outro membro da família *Monacantidae*, chamado de porquinho-marrom, porquinho-de-penacho ou porquinho de frontereta. Tem o corpo alto no formato de um diamante, lateralmente comprimido, medindo em média 20 cm, chegando até 30 cm de comprimento. Apresenta dois espinhos em sua primeira nadadeira dorsal para defesa ou fixação conforme outros espécimes da família *Monacantidae*. Em sua segunda nadadeira dorsal o segundo raio é prolongado, característica de machos adultos. Também possui nadadeira pélvica rudimentar anterior à nadadeira anal e nadadeira caudal arredondada. Possui pele de cor variável do marrom-esverdeado ao amarelado, com manchas irregulares escuras ou claras. Ocorre no oceano Atlântico, em sua porção oeste desde a costa dos EUA

até o Uruguai, habitando águas rasas de cerca de 80 m próximas a costões rochosos, e, portanto, chamado de “peixe de pedra”. Alimenta-se de pequenos crustáceos, esponjas, pequenos invertebrados bentônicos ou ainda algas. Sua carne também é muito apreciada, porém seu valor comercial é menor, provavelmente em função de seu menor tamanho, por ser solitário, não formando cardumes. Em função de seu hábito alimentar e de ser um peixe demersal é muito comum ser capturado em pesca de arrasto de praia, zona de arrebentação, ou com linhae anzol de tamanho específico, preso a iscas como camarão, tiras finas de lulas, ou outras, em função de sua boca diminuta. Quando é incidentalmente capturado em redes de arrasto por pescadores de mar aberto, tem sua carne vendida como ‘mistura’ ou nos comércios locais (NELSON, 2006; SAMPAIO; NOTTINGHAM, 2007; SOUZA; CHAVES, 2007; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2008; FISCHER; PEREIRA; VIEIRA, 2011).

Figura 3 - *Stephanolepis hispidus* (Linnaeus, 1766)



Fonte: (JOHN WHITE, 2008). Sinonímia: Porquinho de pedra, Porquinho-de-frente-reta.

1.7 Constituintes da pele de peixes ósseos

A pele destes teleosteis é formada principalmente por epiderme de origem ectodérmica e a derme de origem mesodérmica, apresentando ainda a hipoderme (camada que une a pele à musculatura).

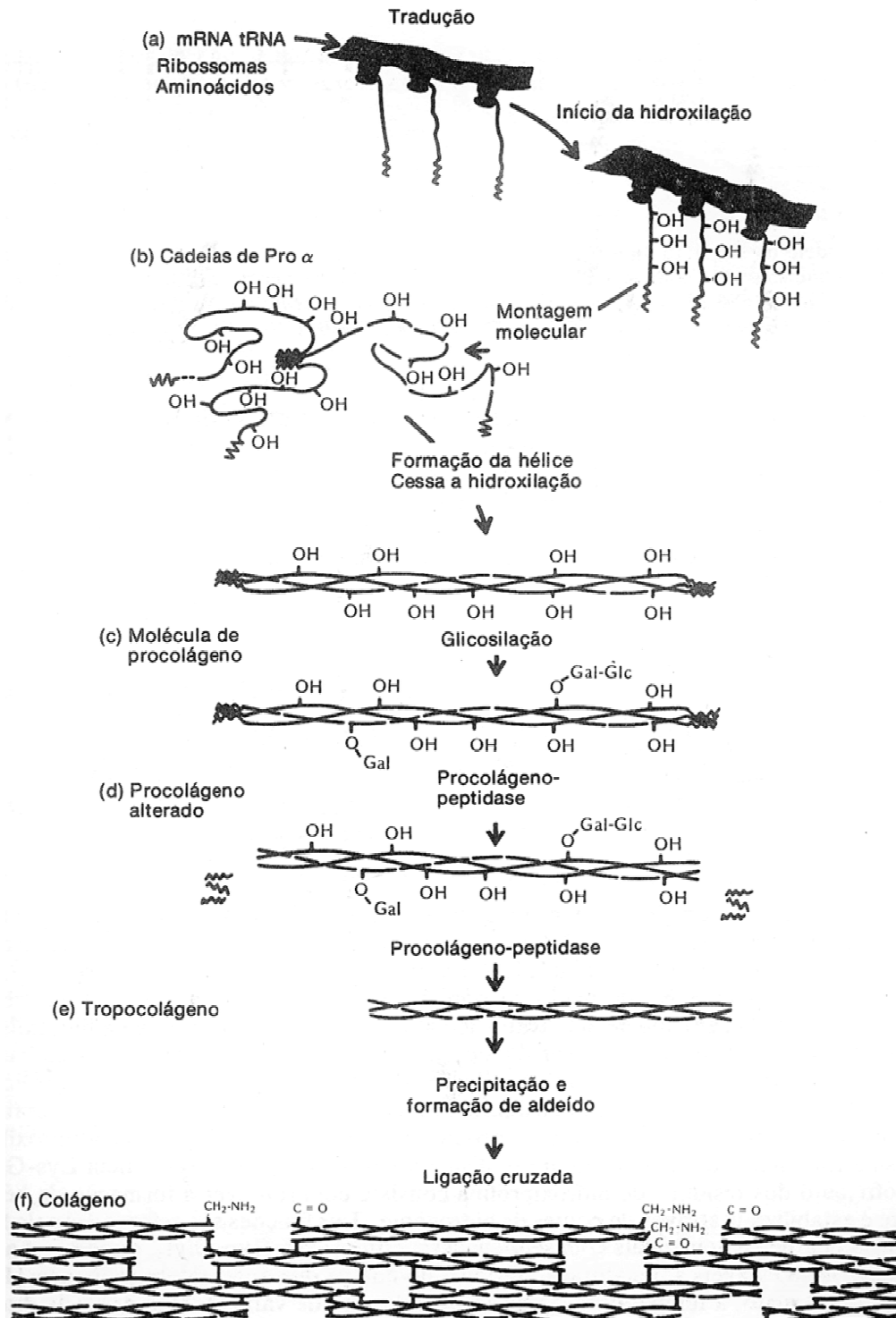
Na epiderme, apresenta uma camada de células epiteliais aplainadas, dispostas em subcamadas, produzindo muco e pigmentos. Nesta mesma camada, há disposição de células mucosas produtoras de mucina, uma glicoproteína com função de hidratação e lubrificação da pele destes animais (BEMVENUTI; FISCHER, 2010).

Em corte histológico da pele de peixes teleósteos, aderme é gradualmente compactada e é possível perceber uma composição em camadas, de fora para o interior. Na porção mais superficial, suas fibras colágenas apresentam-se espessas, frouxas e em formato de pena; à medida que se distanciam da superfície a espessura das fibras colágenas diminui e também o espaço interfibrilar, ou seja, o tecido, nesta porção, apresenta-se mais denso. Em adição, a exemplo da pele do 'pacu' (*Piaractus mesopotamicus*) observa-se a derme composta de feixes colágenos trançados, são camadas sobrepostas de forma que encontram-se em sentido longitudinal às fibras da camada seguinte, em um entrelaçamento em forma de rede (DE SOUZA *et al.*, 2006).

O colágeno é a principal proteína da matriz extracelular de todos os tecidos e possui inúmeras funções, mas principalmente mantém a forma e impede a deformação dos tecidos. Até hoje foram descritos mais de 30 tipos de colágenos, que em cada tecido desempenham um papel estrutural e de sinalização. O colágeno; particularmente abundante nas cartilagens, tendões, veias, pele, dentes e ossos; é o principal constituinte da pele dos peixes, representando em torno de 70% do peso seco deste material (LINDE-MEDINA; MARCUCIO, 2018). As moléculas constituintes do colágeno são secretadas pelo fibroblasto na forma de procolágeno, que são cadeias polipeptídicas com estruturas primárias X-Y-glicina, nas quais a prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina podem ocupar as posições X ou Y, contudo outros aminoácidos também estão presentes em menor quantidade. Esta estrutura primária repetida origina uma α -hélice voltada para a direita. Após a glicosilação no retículo endoplasmático, o procolágeno é clivado nas suas estruturas terminais pelas N e C procolágeno peptidases, liberando o tropocolágeno que irá se precipitar, formando as ligações cruzadas. Essas cadeias de tropocolágeno dispostas paralelamente compõem a fibra colágena e agrupam-se lateralmente por meio de ligações covalentes entre grupamentos aldeído e aminos livres. As ligações cruzadas são covalentes e conferem estabilidade e força tensora a esta estrutura fibrilar, estas ligações são formadas por quatro resíduos de lisina ou alisina ou hidroxilisina ou hidroxialisina. Os tropocolágenos interagem formando tais ligações cruzadas em um arranjo chamado 'cabeça-cauda-torso'. Os tropocolágenos ficam então entrelaçados em feixes paralelos ao longo de um eixo principal. Desta associação é composta a fibrila colágena, estrutura terciária do colágeno. O percurso helicoidal fibrilas terciárias, no

entanto é destrógiro, esta conformação, oposta às fibras individuais, permite um entrelaçamento firme oferecendo grande resistência à tração e minimizando possibilidades de estiramento. Os agregados destas fibrilas ao longo de eixos paralelos com extremidades sobrepostas formam feixes, portanto a estrutura quaternária, o colágeno (BRUCE, 2010; DA SILVA; PENNA, 2012).

Figura 4 - Biossíntese do colágeno



Fonte: (SMITH *et al.*, 1985).

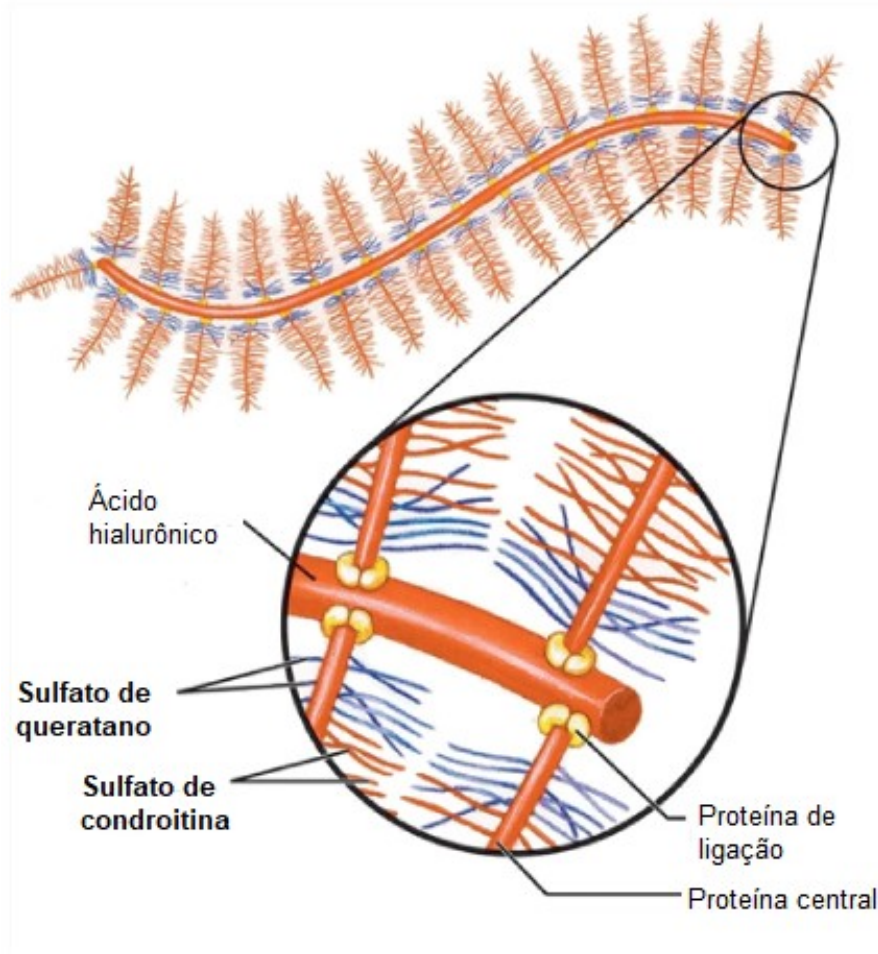
Outro importante componente da matriz extracelular são os agregados de proteoglicanos. Que são compostos por uma quantidade muito pequena de proteína, as proteínas centrais dos proteoglicanos e as proteínas de ligação dos proteoglicanos ao

esqueleto central de ácido hialurônico. O principal componente destes agregados de proteoglicanos são glicosaminoglicanos (GAGs), que são polissacarídeos lineares de carga negativa, pela presença de radicais sulfatados e exibem importantes funções biológicas. Os GAGs são heteropolissacarídeos, com unidades dissacarídica repetidas, acíclicos e sem ramificações. Compostos por dissacarídeos onde sempre há um açúcar aminado (N-acetilgalactosamina ou N-acetilglucosamina) e um ácido urônico (BRUCE, 2010; VÁZQUEZ *et al.*, 2013)

São os maiores constituintes da matriz extracelular, sintetizados no complexo de Golgi na maioria das células animais e além de sua função estrutural, participam da sinalização celular, junto com fatores de crescimento, citocinas e no processo de reconhecimento molecular na superfície de células (KRICHEN *et al.*, 2015; SUFLITA *et al.*, 2015). Como mencionado anteriormente, os GAGs formam agregados poliméricos complexos chamados proteoglicanos, que por sua vez, envolvem as fibras colágenas e por sua carga negativa acabam atraindo íons (sódio) conferindo a matriz uma tensão osmótica que provê hidratação e elasticidade à estrutura da derme (RODRIGUES *et al.*, 2011; VÁZQUEZ *et al.*, 2013). Nos peixes, os proteoglicanos mais importantes são o sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatan (DS) e heparan sulfato (HS), entretanto o DS é o predominante. Em adição, na pele dos peixes há inúmeras glândulas mucosas, cuja secreção, é rica em GAGs, o muco produzido por estas glândulas confere à pele do peixe a regulação da hidratação, facilita o deslizar através da água e protege contra infecções.

Diversas atividades biológicas tem sido atribuídas aos GAGs, tais como atividade antitumoral, anti inflamatória e estes componentes também são matéria prima para a produção de anticoagulantes utilizados a mais de 50 anos para tratamento e prevenção de trombose venosa profunda, pós cirúrgica, pós parto (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Figura 5 - Agregado de proteoglicano de matriz extracelular



Fonte: (NELSON; COX, 2011).

1.8 Algumas evidências científicas acerca das peles de peixes-porco

Alguns dados científicos aqui relacionados fornecem evidências de atividades biológicas encontradas em extratos de peles de algumas espécies de peixes-porco, trazendo o interesse da ciência para este foco.

Cavalli e colaboradores (2003) demonstraram a ação vasodilatadora do extrato da pele do peixe *B.capriscus* no endotélio mesentérico arterial de ratos wistar. Segundo Cavalli, este efeito foi não alterado pela ativação adrenérgica uma vez que β -bloqueadores não foram capazes de intensificar o relaxamento ocasionado pela ação do extrato. Por outro lado, a presença do diclofenaco não modificou o efeito relaxante do extrato excluindo a participação de metabólitos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase. Entretanto a perfusão com água destilada destruiu as células do endotélio arterial reduzindo significativamente o efeito do tratamento com o extrato da pele do peixe *B.capriscus*. Em tratamento com o inibidor da óxido-nítrico-sintase (NOS), a N^G -nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME), houve a redução

dos efeitos vasorelaxantes do extrato, indicando que este efeito se deve à mecanismos relacionados à produção de óxido nítrico (NO) por células endoteliais em sinergia com fatores relaxantes derivados do endotélio (CAVALLI et al., 2003).

Pesquisadores realizaram a caracterização química da pele e do músculo de dois pescados do litoral sul do Rio Grande do Sul, empregados no tratamento da asma. Ambos os peixes, *B. caprisacus* e o *Meticirrhus litoralis* (papa-terra) foram avaliados em sua composição centesimal, mais especificamente em seu teor de fosfolipídios. Os pesquisadores verificaram diferença da relação fosfolipídeo/gordura entre as espécies, com vantagem para a pele do peixe porco, que apresentou maiores teores de fosfolipídeos. É importante mencionar que os fosfolipídios conferem caráter antioxidante protegendo as membranas celulares e estão na constituição das fosfoproteínas (FURLONG et al., 2006).

Até o momento, referente aos efeitos da pele do peixe *S. hispidus* avaliou-se o seu potencial vasodilatador, em ratos wistar com hipertensão arterial induzida por L-NAME. Em ratos tratados com o extrato aquoso da pele de peixe porco, foi possível restaurar a pressão sanguínea aos níveis normais. Atribui-se ao óxido nítrico o efeito vaso-relaxante obtido com o extrato da pele do peixe-porco, pois foi possível observar que em ratos tratados cronicamente com L-NAME, que apresentaram elevação de pressão sanguínea, houve depleção dos níveis de óxido nítrico plasmáticos e do tecido aórtico. Esse dado é confirmado pelo tratamento com inibidores da NOS que passaram a apresentar redefinição da natriurese pressórica para níveis mais elevados de pressão arterial (MUCCILLO-BAISCH; BRUM; ANDRADE, 2007).

Avaliando um potencial efeito analgésico do extrato aquoso da pele do peixe *S. hispidus*, nosso grupo investigou o efeito do extrato aquoso em diferentes modelos de nocicepção (teste de contorção, teste da placa quente e teste de retirada da cauda). Nos modelos de contorção e em modelo experimental da placa quente o tratamento intraperitoneal com extrato aquoso da pele do peixe porco foi capaz de inibir contrações induzidas por ácido acético, bem como, foi verificada redução da hiperalgesia induzida por carragenina e prostaglandina E2 (PGE₂), respectivamente. No teste de retirada da cauda não foi possível obter mudanças no perfil de latência, no entanto, é necessário considerar a via oral de administração do extrato aquoso. A Naloxona, um fármaco antagonista de opióides, foi empregada para bloqueio da atividade atinocéptica deste extrato então relacionando este efeito inibitório à mecanismos neurogênicos da dor por meio de receptores opióides supra-espinhais sensíveis aos anti-inflamatórios não esteroidais (CARVALHO et al., 2013).

Em adição ao acima exposto, recentemente, em 2015 um grupo de pesquisa da Tailândia utilizou um concentrado de proteína hidrolizada derivada da digestão da pele do

peixe *A.monoceros* com a enzima glicil-endopeptidase parcialmente purificada. Este composto utilizado em uma sequência de testes *in vitro* mostrou atividade antioxidante, protegendo a linhagem pró-monocítica U937 do dano ao DNA, induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Somado a isso mostrou efeito imunomodulatório reduzindo a produção de citocinas IL-1 β e IL-6 e NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e atividade antiproliferativa demonstrada em linhagem de câncer de colon (Caco-2) (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2016).

A cultura popular atribui à pele dos peixes-porco propriedades farmacológicas, pois, segundo o saber popular, contém substâncias capazes de amenizar os sintomas de asma brônquica. Entretanto, alguns pescadores apontam a pele do peixe *Stephanolepishispidus* como a apropriada para fins terapêuticos entre as espécies descritas neste trabalho.

As peles dos peixes-porco são couros resistentes, de textura áspera, retiradas facilmente; os pescadores as utilizam através da infusão em água, no preparo de chás ou as consomem secas à temperatura ambiente e trituradas sobre alimentos (CAVALLI *et al.*, 2003; MUCCILLO-BAISCH; BRUM; ANDRADE, 2007; CARVALHO *et al.*, 2013). Esta utilização junto à alimentação, para fins antiinflamatórios ou para tratamento profilático da asma, atraiu a comunidade científica no sentido de conferir caráter científico a este conhecimento popular por meio da comprovação das atividades atribuídas a este produto natural.

1.9 Panorama da asma

A asma é uma doença caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas inferiores, hiper-responsividade e alterações estruturais brônquicas, que culmina com a limitação do fluxo aéreo, que pode ser desencadeada por fatores ambientais associados à predisposição genética (CAMPOS, 2005).

Um levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta que a asma afeta 235 milhões de indivíduos globalmente, e esta estimativa pode se ampliar a 300 milhões de pessoas (BARRETO *et al.*, 2014; WHO MEDIA CENTRE, 2017).

Segundo Marsoli e colaboradores (2004), o Brasil se encontra entre os países com maior prevalência dos sintomas clínicos da asma, em torno de 11,4% da população (MASOLI *et al.*, 2004). Em 2008 foi a 3ª maior causa de internação hospitalar pelo SUS, com cerca de 300 mil hospitalizações em função da doença (SAS/MS, 2013). E ainda, segundo os dados mais recentes do Ministério da Saúde, a prevalência da asma está em torno de 6,4

milhões de brasileiros acima dos 18 anos; segundo dados do estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância, no Brasil, cerca de 20 a 30% das crianças e adolescentes de grandes metrópoles brasileiras apresentam sinais sugestivos de asma. Entre estes casos, 5 a 10 % apresentam maior morbimortalidade onde, este percentual de pacientes são responsáveis por um consumo desproporcional de recursos de saúde, encaminhando-se às unidades de emergência até 15 vezes mais e necessitando de hospitalização 20 vezes mais que os asmáticos moderados (SAS/MS, 2013; BARRETO et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; SOUZA-MACHADO, 2016).

1.10 A patologia da asma

Aspectos ambientais, genéticos, nutricionais, psicossociais entre outros, tem sido usados na tentativa de explicar o aumento da prevalência da asma nas últimas décadas, contudo, a qualidade do ambiente ainda é determinante neste crescimento (BARRETO *et al.*, 2014). Até o momento, os indícios apontam que a exposição à alérgenos ambientais comuns, poeira, pólen, pêlos de animais, entre outros, junto a fatores genéticos, em um período crítico da vida, durante o desenvolvimento das estruturas e funções das vias aéreas, podem contribuir para a pré-disposição do indivíduo. Devido a esta suscetibilidade, múltiplos grupos celulares, epiteliais, endoteliais, entre outros, produzem uma ampla gama de substâncias que desencadeiam a ativação e recrutamento de linfócitos, mastócitos, eosinófilos e promovem a hiperresponsividade de células neurais e musculares, desencadeando a apresentação clínica da asma (CAMPOS, 2005).

O curso clínico de um ataque de asma é caracterizado principalmente por dificuldade expiratória, pois o paciente consegue inspirar com dificuldade, no entanto não é capaz de expirar, progredindo para a hiperinsuflação, que leva à dispnéia recorrente, sensação de aperto no peito, irritação no nariz ou garganta, tosse excessiva levando a dor torácica, boca seca e vermelhidão que tipicamente ocorrem após a exposição do fator desencadeante da crise. Nos casos usuais a crise dura de uma a várias horas, regredindo com o tratamento, que deve ser imediato, visto que a obstrução do fluxo expiratório ocasionalmente pode levar a hipercapnia, acidose e grave hipóxia, podendo ser fatal, embora seja, na maioria dos casos, debilitante (ABBAS et al., 2005).

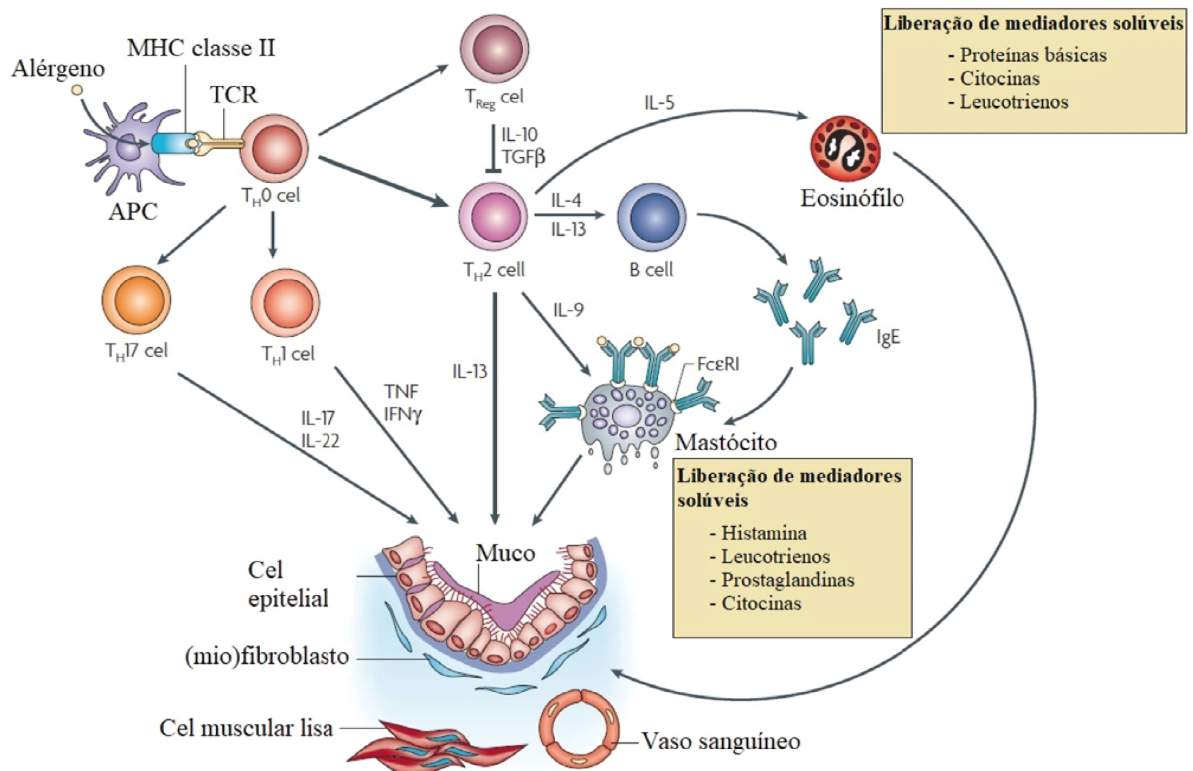
Como a asma é uma doença iniciada por múltiplos fatores, alguns esquemas de classificação são necessários, ou seja, a asma pode ser considerada alérgica (atópica ou extrínseca), em 70% dos casos, ou não alérgica (não atópica ou intrínseca), iniciada por

estímulos não imunológicos como estresse, infecções pulmonares causadas por vírus, exercício, entre outros; mas apesar disso, a fisiopatologia de ambas ocorre por mecanismos similares (ABBAS et al., 2005; KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013).

A resposta alérgica inflamatória é caracterizada pela apresentação de epítopos do alérgeno por uma célula apresentadora de antígeno (APC) via MCH de classe II (complexo principal de histocompatibilidade) a células T naive, que irão se direcionar para um perfil T_H2 de resposta, no qual o fator de transcrição GATA3 irá mediar a secreção de citocinas importantes para esta resposta. O desequilíbrio entre as células de perfil T_H2 de resposta e T_H1 caracterizam a imunidade da resposta alérgica (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Estas células, quando co-estimuladas aumentam a expressão de genes que codificam as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF, que estão relacionadas a mudança de classe de células B para a síntese de IgE, recrutamento de mastócitos, maturação de eosinófilos e basófilos, consideradas as principais células mediadoras da resposta alérgica (HOLGATE; POLOSA, 2008). As células T reguladoras (Treg), caracterizadas pela expressão de FOXP3 e receptor para IL-2 (CD25), também podem estar relacionadas a este tipo de resposta, visto que podem suprimir a resposta T_H2 através da secreção de IL-10 e TGF- β , conforme representado esquematicamente os mecanismos celulares na figura 6 (MARTÍN-OROZCO; NORTE-MUÑOZ; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2017).

Figura 6 - Representação da resposta asmática



Fonte: Adaptado de (HOLGATE; POLOSA, 2008).

A célula T_{H17}, responsável pela secreção de IL-17A, foi identificada nas vias aéreas de pacientes asmáticos e foi relacionada com o influxo de neutrófilos, que induz a produção do fator quimioatraente IL-8 (DRAGON, S., RAHMAN, M. S., YANG, J., UNRUH, H., HALAYKO, A. J., & GOUNNI, 2007). Quando o indivíduo tiver contato com o alérgeno, moléculas de IgE irão estimular a degranulação de mastócitos (através do receptor FcεRI) de mediadores solúveis (relacionados com a resposta imediata) tais como histamina, prostaglandinas e citocinas que atuarão no recrutamento de macrófagos, eosinófilos e basófilos (relacionados a resposta tardia de 6-72h) (HOLGATE; POLOSA, 2008).

A fase imediata da reação de hipersensibilidade tipo I mediada por IgE tem como características principais a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e os espasmos da musculatura lisa, apresentados em até 30 minutos da exposição alérgica do indivíduo já sensibilizado, sendo o componente primário é o mastócito ou basófilo (KUMAR, 2007). Uma vez secretada a IgE específica, mastócitos serão sensibilizados pela interação entre a IgE e seu receptor de alta afinidade FcεRI. A molécula da FcεRI possui 3 subunidades, a cadeia α interagindo com a IgE, e as subunidades β e γ com domínios internos que quando fosforilados participam da sinalização intracelular. Estes mastócitos sensibilizados, recobertos

de IgE, ficam prontos para reação em caso de nova interação com o antígeno (KUMAR, 2007; ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI, 2012).

A nova exposição ao alérgeno deflagra uma cascata de sinalização que culmina com a elevação dos níveis de cálcio citoplasmático do mastócito, levando à desmontagem de complexos de actina e miosina submembranares, permitindo a fusão dos grânulos com a membrana plasmática e consequente liberação de seus conteúdos. Níveis elevados do cálcio também contribuem para a ativação da enzima citosólica fosfolipase A2 (PLA2), que hidrolisa os fosfolípidos da membrana pela via da ciclo-oxigenase, para liberar substratos convertidos em mediadores finais como a prostaglandina D2 (PGD2) acarretando broncoespasmo intenso e aumento na secreção de muco. Leucotrienos C4 e D4 também são gerados, com ação vasoativa e espasmogênica, sendo estes, os agentes mais potentes. O LTB4 é altamente quimiotático para neutrófilos eosinófilos e monócitos (ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI, 2012).

Aminas vasoativas como a histamina são liberadas dos grânulos para o meio extracelular, implicando diretamente sobre o aumento da permeabilidade vascular, causando vasodilatação, contração da musculatura lisa e elevação da secreção de muco. Outros mediadores liberados incluem a adenosina também presente neste conteúdo causa broncoconstrição e inibe a agregação plaquetária; fatores quimiotáticos para neutrófilos e eosinófilos; e proteases como a triptase que possuem potencial de dano aos tecidos (KUMAR, 2007; ABBAS, ABUL; LICHTMAN, ANDREW; PILLAI, 2012).

A degranulação dos mastócitos também resulta na liberação de citocinas importantes para o estabelecimento da fase tardia. O TNF α , a IL-4, a IL-5 promovem a inflamação rica em neutrófilos e eosinófilos, a IL-13 age nas células epiteliais induzindo a secreção de muco, quimiocinas como eotaxina-1, MIP-1 α e RANTES, são sintetizadas e secretadas dando procedência à fase tardia com a ativação e quimiotaxia de células TCD4⁺, macrófagos e eosinófilos; estímulo a produção de IgE antígeno específica pelos linfócitos B (STELEKATI; ORINSKA; BULFONE-PAUS, 2007). Vale ressaltar a participação dos linfócitos TCD4⁺, que também são recrutados ao local da lesão, e em resposta à interação com o alérgeno e continuam produzindo fatores de transcrição determinantes da manutenção do padrão de resposta T_H2 e intensificando o quadro alérgico (LARCHÉ; ROBINSON; KAY, 2003; KUMAR, 2007).

O epitélio tem um papel importante no processo alérgico, os mediadores como a histamina e leucotrienos são capazes de aumentar a expressão endotelial de moléculas relacionadas a migração (P e E selectinas, ICAM e VCAM). Além disso, quimiocinas como

CCL2, CCL8, CCL7, CCL13, CCL3, CCL24, CCL26 E CCL5, também foram relacionadas ao processo asmático, influenciando no infiltrado inflamatório (HOLGATE; POLOSA, 2008).

O eosinófilo é o efetor central responsável pela amplificação da inflamação das vias aéreas, sua função efetora consiste em liberação de substâncias tóxicas com o potencial de danificar a mucosa e nervos associados por meio da liberação de seus grânulos contendo a proteína básica principal (MBP) e da proteína catiônica de eosinófilos (ECP). Os mediadores lipídicos derivados do eosinófilo causam a broncoconstrição e a hipersecreção de muco, liberando ainda espécies reativas de oxigênio, e metaloproteinase-9 (MMP-9) que também geram injúrias na mucosa. Além destes fatores, eosinófilos continuam conjuntamente com os linfócitos TCD4⁺ a IL-5 recrutadora de mais eosinófilos, a IL-4 estimuladora de linfócitos B e a IL-13, indutora da produção de muco (LARCHÉ; ROBINSON; KAY, 2003). Esta dinâmica de lesão tecidual, hipersecreção de muco, hiperresponsividade ao estímulo, contração da musculatura lisa brônquica, infiltrado tecidual inflamatório edema são os fatores responsáveis pela oclusão do lúmen brônquico acarretando dificuldade respiratória observada na asma (CAMPOS, 2007).

O eosinófilo produzido na medula óssea, inicialmente se diferencia em um precursor híbrido compartilhando propriedades com basófilos, a linhagem eosinofílica é então determinada por fatores de transcrição como GATA-1. As eosinofiloetinas IL-3, IL-5 e GM-CSF coordenam a expansão deste tipo celular. A ativação e migração para circulação é regulada pela IL-5, que adicionalmente determina o aumento da permanência de eosinófilos no sangue periférico. O encaminhamento para o foco da inflamação é principalmente orientado pela presença da eotaxina-1 e seu receptor de eotaxinas CCR3 também se liga a quimiocinas como CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4) e CCL5 (RANTES). A adesão e o trânsito do eosinófilo pelo tecido inflamado depende da família das integrinas $\beta 2$ (CD18), incluindo CD11a (LFA-1) e CD11b (Mac-1) que interagem diretamente com a molécula CD54 (ICAM-1) expressa no endotélio, e a molécula CD49d (VLA-4) da família das integrinas $\beta 1$, que interage com o endotélio via CD106 (VCAM-1) e fibronectina (KUMAR, 2007).

Outro nível de ativação do eosinófilo é mediado pela IgE, em seu estado não ativado, não expressam receptores de IgE de alta afinidade e apresentam resistência à liberação do conteúdo de seus grânulos. Após ativação por quimiocinas e citocinas, o limiar para a sua degranulação cai, pela expressão de Fc ϵ RI, aumenta a expressão de receptores Fc γ e receptores para complemento, deixando assim o eosinófilo pronto para sua resposta efetora (KENNETH MURPHY, PAUL TRAVERS, 2010).

O conjunto de lesões decorrente dos sucessivos episódios inflamatórios, leva às lesões anatomopatológicas observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos, processo este que recebe o nome de remodelamento brônquico. As características mais observadas nesta condição são a lesão do epitélio ciliado estratificado, deposição de fibras colágenas (fibrose) e hiperplasia dos elementos constitutivos do sistema respiratório (microvasos, células caliciformes, musculatura lisa e nervos) tipicamente relacionadas a inflamação eosinofílica (CAMPOS, 2005a, 2007).

A estratégia para a melhora da qualidade de vida de um paciente de asmático abrange não só o controle da doença, mas também a exposição a futuros riscos, para tanto, é necessário o cuidado com o ambiente associado ao uso de medicamentos evitando o desencadeamento de novas crises. O tratamento deve possuir como objetivos controlar os sintomas, identificar e eliminar os fatores desencadeantes e por fim minimizar a necessidade de medicações para o alívio de sintomas (SAS/MS, 2013).

No manejo da asma, são consideradas tanto a abordagem profilática quanto de alívio de sintomas, ressaltando que quando a profilaxia é eficaz, há uma redução da necessidade de terapia de resgate. Nas terapias para alívio imediato, indicadas para casos de asma intermitentes, o tratamento é direcionado para o uso de broncodilatadores agonistas β_2 -adrenérgicos de curta duração, capazes de relaxar a musculatura lisa que revertem imediatamente a obstrução das vias respiratórias, reduzindo a dispnéia (CAMPOS; CAMARGOS, 2012). Onde há necessidade de terapia combinada o ajuste desejado é a obtenção da menor dose com efeito controlador para fins de minorar os potenciais efeitos adversos, bem como a redução dos custos. Tipicamente são utilizados medicamentos como: broncodilatadores agonistas β_2 -adrenérgicos, também como broncodilatadores seletivos pela ação em receptores β_2 da musculatura lisa brônquica; metilxantinas, mecanismos atribuídos a inibição de fosfodiesterases, antagonismo do receptor de adenosina, liberação de IL-10; antagonistas colinérgicos muscarínicos, bloqueiam a ação da acetilcolina, reduzindo a broncoconstrição e a secreção; corticosteroides, capazes de influenciar diretamente no processo inflamatório (relatados no quadro 1) (SAS/MS, 2013).

A associação de fármacos controladores e corticóides por via oral se faz indicada nas exacerbações moderadas a graves. Nestes casos, obtém-se o controle do estado do paciente em até dez dias, que deve dar prosseguimento à terapêutica com o uso de corticoterapia inalatória (SAS/MS, 2013). No entanto, terapias com esses medicamentos não são totalmente eficazes e, em alguns casos, podem causar efeitos adversos (SAS/MS, 2013).

Quadro 1 - Abordagem geral para o manejo das manifestações clínicas na asma (IV Diretrizes para o Manejo da Asma)

Gravidade	Alívio	Primeira Escolha	Alternativa	Uso de Corticoide Oral
Intermitente	Beta2 de curta duração	Sem necessidade de medicamento de manutenção		
Persistente Leve	Beta2 de curta duração	CI dose baixa	Montelucaste Cromonas *	Corticosteroide Oral nas exacerbações graves
Persistente Moderada	Beta2 de curta duração	CI dose moderada (*) a alta ou CI dose baixa a moderada, associado a LABA	Baixa a moderada dose de CI associada Anti-leucotrieno ou Teofilina	Corticosteroide Oral nas exacerbações graves
Persistente Grave	Beta2 de curta duração	CI dose alta (*) CI dose alta + LABA	Alta dose de CI + LABA, associado Anti-leucotrieno ou Teofilina	Cursos de Corticoide Oral a critério do médico, na menor dose para se atingir o controle

Fonte: Adaptado de (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

CI = Corticosteroide inalatório, LABA = β 2 agonista de longa duração, (*) = Especialmente em crianças menores de 4 a 6 anos.

Não há registros, estudos ou informações científicas que descrevam algum componente bioativo da pele dos peixes porco, ou que apontem sua eficácia contra a asma, da mesma forma, não há registros de toxicidade decorrente de seu uso. Nesse sentido, promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais do uso de produtos naturais como recurso terapêutico, de forma alternativa e/ou complementar, é de suma importância. Estas práticas não convencionais de saúde continuam sendo adotadas pela população. Pode-se dizer que a mudança de hábitos relacionados à saúde entre estes usuários dificilmente ocorrerá, pois estes costumes estão arraigados a aspectos socioculturais, transmitidos entre diferentes gerações no seio familiar ou na comunidade. A comprovação empírica desses produtos, baseada em experiências anteriores, contribui para a crença sobre sua eficácia e utilidade, muito embora estas não tenham sido comprovadas cientificamente.

Tendo em vista que as populações caiçaras realizam habitualmente esta prática, faz-se necessário buscar a confirmação da segurança deste conhecimento popular. Da mesma forma, e não menos importante, se faz necessário o conhecimento do potencial terapêutico destes produtos e a identificação das substâncias que lhe conferem a sua propriedade terapêutica, evitando riscos à saúde da população que realiza este consumo, assim mediando o contato com um produto natural de origem animal. Portanto, respeitando as tradições para que se estabeleça o convívio saudável entre os saberes popular e científico.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a atividade anti-inflamatória do tratamento com a pele dos peixes porco *A. monoceros* e *S. hispidus* em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica em camundongos, bem como avaliar a toxicidade decorrente desta prática, fornecendo as primeiras informações sobre potenciais riscos deste uso.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade dos pulverizados das peles dos peixes-porco *A. monoceros* e *S. hispidus* em modelo experimental de pleurisia alérgica em camundongos da linhagem Balb/c, por meio de alterações no recrutamento celular e na acumulação de mediadores no infiltrado inflamatório;
- Investigar o efeito antialérgico do pulverizado da pele dos peixes porco em modelo experimental *in vivo* de inflamação pulmonar alérgica em camundongos pelas alterações no recrutamento celular em lavados broncoalveolares e em sangue periférico;
- Verificar a atividade antiedematogênica do pulverizado das peles dos peixes porco em modelo de edema de pata induzido por ovalbumina e histamina;
- Avaliar a toxicidade oral aguda *in vivo* decorrente do uso destes pulverizados em modelo murino conforme protocolo de doses fixas da OECD 420;
- Realizar hidrólise enzimática dos pulverizados e as avaliações químicas preliminares dos produtos obtidos deste fracionamento;
- Avaliar a atividade dos pulverizados e dos produtos de sua hidrólise por meio de ensaios *in vitro* com linhagem basofílica RBL-2H3 e em linhagem de macrófagos murinos J774-A1

- Avaliar a toxicidade *in vitro* dos pulverizados e produtos obtidos com hidrólise enzimática nas linhagens RBL-2H3 e J774-A1, pelo do ensaio de viabilidade celular com resazurina (ALAMARBLUE[®]).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de materiais

3.1.1 Coleta e identificação

As amostras do peixe *Aluterus monoceros* (AM) e do peixe *Stephanolepis hispidus* (SH) foram coletadas no comércio pesqueiro localizado no Porto do Forno, Arraial do Cabo, Estado do Rio de Janeiro. As amostras foram identificadas taxonomicamente pelo grupo de pesquisa do Dr. Lohengrin Dias de Almeida Fernandes, do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). Um exemplar de voucher foi depositado na coleção do IEAPM e outro exemplar, depositado na coleção do Instituto da Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, CNPJ nº 33.663.683/ 0038-08 credenciada como fiel depositária de amostras de componentes do patrimônio genético. A licença para acesso e remessa de componente do patrimônio genético para fim de pesquisa científica foi solicitado junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) sob o número: 010377/ 2013-1.

3.1.2 Obtenção do pulverizado da pele dos peixes

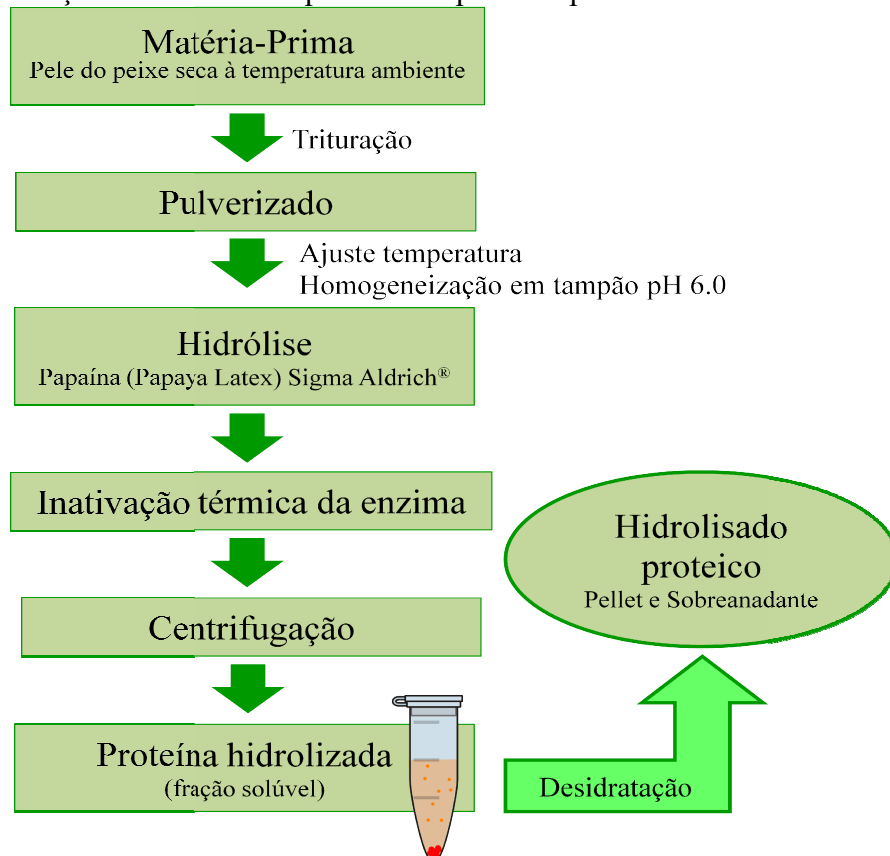
As peles dos peixes foram secas à temperatura ambiente e trituradas em liquidificador industrial diversas vezes até a obtenção de um pó. Este pulverizado foi utilizado nos tratamentos em suspensão do pó, em banho com água morna, na temperatura máxima de 40°C por 1h, finalmente a suspensão é administrada ao animal.

3.1.3 Obtenção do hidrolizado a partir do pó da pele dos peixes AM e SH

O pulverizado das peles dos peixes foi hidrolisado mediante o uso da papaína em uma concentração final de 20U/g de tecido. Na extração, cerca de 50 mg do pulverizado de AM e SH foi lavado com água destilada gelada (4° a 5° C) e centrifugado a 10.000 \times g por 15 min à 4° C. Em seguida, a água foi removida e o pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 contendo papaína (EC.3.4.22.2) do látex de *Carica Papaya* (P3375/ Sigma-Aldrich®). A hidrólise ocorreu durante o período de 20 h a temperatura de 37° C, em agitação leve e alternada (30 em 30 minutos). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 \times g/4° C/ 30 min, o pellet e o sobrenadante obtidos foram separados e

liofilizados. O protocolo de hidrólise está ilustrado em esquema da figura 7 e foi adaptado de (AHMAD; BENJAKUL, 2010).

Figura 7 - Obtenção do hidrolisado proteico da pele dos peixes AM e SH



Fonte: (Do autor, 2017).

3.2 Animais

Camundongos BALB/c machos e fêmeas, foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB), FIOCRUZ. Considerações sobre Aspectos Éticos: todos os experimentos que incluem manipulação animal neste projeto foram realizados de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, licença n. 17/2013-1. Os ensaios foram realizados no Serviço de Animais de Laboratório (SAL) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Todos os animais passaram por um período de aclimatação de pelo menos 48 h antes da iniciação dos procedimentos *in vivo* descritos. Os grupos foram divididos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame galvanizado medindo 30x 20x 13 cm para até seis camundongos por caixa, ou em necessidade de mais animais, foi utilizada a caixa de 41x 34x 16 cm para melhor acomodação. As caixas contendo os animais foram mantidas em estantes ventiladas com fluxo de ar e termômetro

digital para controle da temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) com umidade relativa do ar entre 50 a 90% e ciclos de 12 h de claro e escuro.

A troca de água foi feita diariamente, fornecida aos animais em bebedouro do tipo mamadeira emgarrafa autoclavável de polipropileno com capacidade para 250 ou 500 mL, com tampa de borracha e bico em aço inoxidável. A ração, da marca Nuvilab[®], foi fornecida *ad libitum* exceto nos períodos de jejum dos animais que antecederam os procedimentos experimentais.

3.2.1 Toxicidade oral aguda decorrente da administração do pó da pele do peixe-porco

Para obtenção das primeiras informações referentes à toxicidade do pó da pele dos peixes AM e SH, utilizamos adaptação do teste de doses fixas, estabelecido em 1992 pela OECD, revisado em 2001, o qual pressupõe procedimentos para avaliação de sinais que possam indicar a menor dose que cause toxicidade evidente. Avaliamos uma única dose de 2000 mg/ kg dos pulverizados, administrada dentro de um período máximo 24 h, conforme o requerido pelo protocolo de doses fixas da OECD. Cada um dos 3 grupos com 5 camundongos BALB/c fêmeas (controle e grupos dos pulverizados da pele AM e SH), receberam 450 μL de NaCl estéril como veículo (v.o.) em dois momentos com intervalo de 1 h, ou 2000 mg/ kg dos pulverizados administrados em duas doses de 1000 mg/ kg em 450 μL do veículo (v.o.) com intervalo de 1 h entre as aplicações, somando a maior dose estabelecida pelo protocolo para avaliação de toxicidade oral aguda. A partição da massa administrada em duas doses e o maior volume na administração foram necessários em virtude da dificuldade para realização do procedimento, uma vez que a cânula esofágica obstruía com os fragmentos dos pulverizados.

Para fins de reduzir o grupo de animais a serem submetidos ao protocolo experimental, na avaliação da toxicidade oral aguda, foi utilizada a dose limite. Nas avaliações do efeito biológico dos pulverizados frente a indução de processos inflamatórios, foi necessário utilizar a massa de 500 mg/ kg, portanto, de acordo com o protocolo da OECD, a dose de 2000 mg/ kg seria a única dose superior, consistindo em quatro vezes a dose utilizada nos modelos de avaliação do efeito biológico dos pulverizados das peles dos peixes.

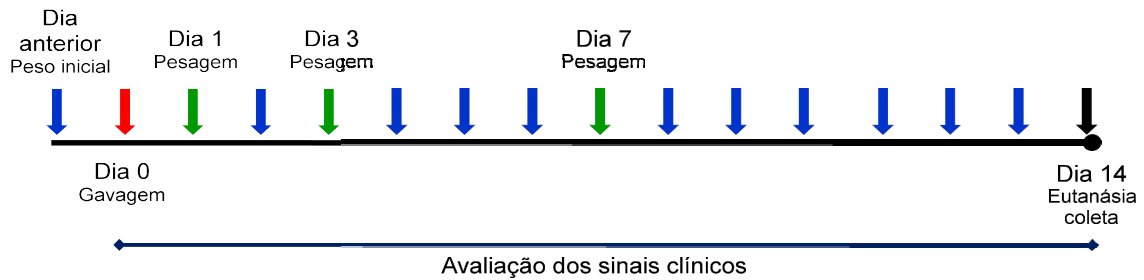
De acordo com o Guia da OECD, após administração oral, os animais foram acompanhados por 14 dias, conforme ilustração na figura 8, para avaliação dos seguintes aspectos: ingestão alimentar, sinais clínicos (avaliados diariamente) e avaliação do peso corporal por meio de registros nos dias 1, 3, 7 e 14. A avaliação clínica consistiu em

observação individual não invasiva do animal imediatamente após: 15, 30, 60 e 120 minutos da última administração, para observação de efeitos agudos, e nos 13 dias seguintes, totalizando 14 dias de observação. A procura por sinais que pudessem evidenciar algum grau de toxicidade contemplou os seguintes itens: exploração do ambiente da caixa, vocalização incomum, resposta exagerada ao toque, reflexo de pinçamento da cauda, reflexos auricular e palpebral (com auxílio de uma pinça), evidência de ataxia, piloereção, dacriorréia (secreção ocular), ptoses (fechamento assimétrico das pálpebras) e alterações na defecação como volume e aspecto.

Finalizados os 14 dias de observação, os animais foram eutanasiados utilizando o protocolo anestésico com cetamina 140 mg e xilazina 20 mg em 200 μ L por via intraperitoneal (ip.). Durante necropsia, além da coleta do sangue para posterior avaliação, foi feita a observação dos órgãos *in situ* para avaliação macroscópica de alterações anatomo-patológicas que pudessem sinalizar eventos de toxicidade. Os órgãos selecionados para pesagem isolada foram: os rins, o fígado e o baço. O peso absoluto foi registrado a partir da pesagem direta de cada órgão, e o peso relativo foi obtido por meio do cálculo do peso absoluto do órgão dividido pelo peso do animal, multiplicado por cem, para obtenção da proporção do peso do órgão (g) por 100 g do peso corpóreo.

Para obtenção do sangue foi realizada a punção da aorta abdominal, utilizando a seringa de 1 mL e agulha 25 x 0,7 mm. Para a avaliação hematológica foi realizado o esfregaço sanguíneo para utilização em contagem diferencial. Para a obtenção de hematócrito e número de hemácias, o sangue foi acondicionado em tubo com anticoagulante EDTA. As análises séricas foram realizadas pela Plataforma Tecnológica de Análises Clínicas do ICTB do Programa de Desenvolvimento e Insumos para a Saúde – PDTIS da Fiocruz. Foram avaliados os seguintes parâmetros: enzimas aspartato-aminotransferase (TGO), alanino-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, creatinina e colesterol total.

Figura 8 - Protocolo do teste de toxicidade oral aguda OECD 420



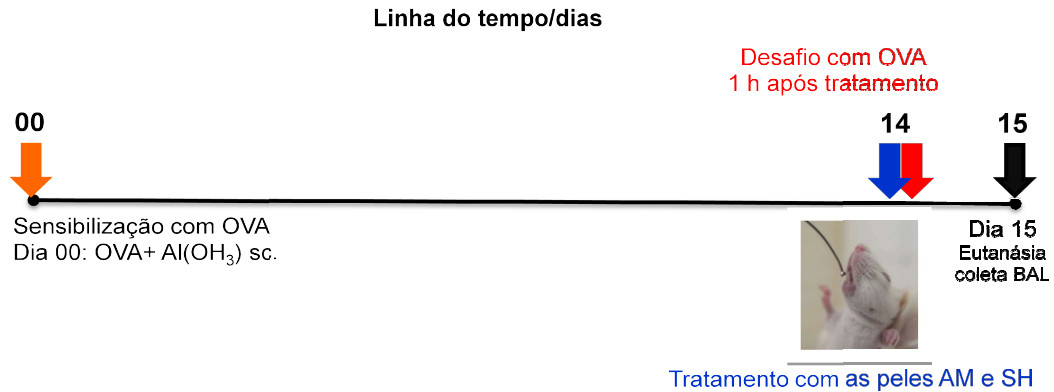
Fonte: (Do autor, 2017).

Os animais em jejum prévio de 4 h e pesados no dia anterior, foram tratados por v. o., no dia 0, em dois momentos intervalados de 1 h, com suspensão de 1000mg dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH em 450µL de salina estéril (veículo) ou somente o veículo para o grupo controle. Após a segunda administração do tratamento os sinais clínicos dos animais foram avaliados individualmente em 15, 30, 60 e 120 minutos no primeiro dia, e uma única vez nas avaliações subsequentes. A ingestão alimentar foi avaliada diariamente. Foram realizadas pesagens nos dias 1, 3, 7 e 14 após a administração do tratamento. Após a última pesagem, no 14º dia, a eutanásia foi realizada para avaliações macroscópicas dos órgãos, coleta de fígado, baço e rins para pesagem e coleta de sangue para avaliação hematológica e bioquímica.

3.2.2 Pleurisia alérgica

A resposta inflamatória na cavidade pleural foi induzida após única sensibilização do animal com ovalbumina (50 µg OVA+ 5 mg Al(OH)₃/ 200 µL) Sigma-Aldrich®, por via subcutânea dorsal conforme protocolo previamente descrito em (FERRARIS et al., 2012), diagramado na figura 9. O desafio foi realizado no décimo quarto dia após a sensibilização, por injeção intratorácica contendo 50 µg de OVA em 100 µL de solução salina estéril nos animais conscientes utilizando um cursor plástico com a finalidade de evitar a perfuração do pulmão do animal. Antes do desafio (1h), foi realizado o tratamento com dexametasona (10 mg/ kg) e com o pó das peles dos peixes AM e SH nas doses de 125, 250, 500 e 750 mg/ kg em 200 µL de solução salina estéril. Vinte e quatro horas após o desafio os animais foram então eutanasiados para coleta do lavado pleural. A coleta foi realizada através de abertura da cavidade peritoneal do animal em decúbito dorsal, seguida de perfuração do diafragma para injeção de 1 mL de PBS/ EDTA 10 mM, pH 7,4 estéril que foi recolhido com o auxílio de pipeta automática. Essas amostras seguiram para análise de quantidade de proteínas totais, contagem total e diferencial de leucócitos e quantificação dos mediadores químicos.

Figura 9 - Protocolo de pleurisia alérgica



Fonte: (Do autor, 2015).

Os animais foram sensibilizados por via subcutânea dorsal uma única vez no dia 0 com 50 μg de OVA + Al(OH)_3 em 200 μL de salina estéril. Passados 14 dias, os animais, em jejum prévio de 4 h, foram submetidos a um pré-tratamento por v. o. com o veículo (200 μL de salina) para o grupo controle, dexametasona 10 mg/ kg para o controle tratado (positivo) ou suspensão contendo 500 mg/ kg dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH para os grupos teste. Após 1 h, os animais foram desafiados por via i.pl. com 50 μg de OVA em 100 μL de salina estéril. A eutanásia foi realizada 24 h após o desafio para a obtenção do lavado pleural.

3.2.3 Inflamação pulmonar alérgica

O protocolo utilizado para o procedimento de inflamação pulmonar alérgica foi adaptado de (RODRIGUES et al., 2012). A indução do processo inflamatório alérgico pulmonar foi realizada após dois eventos de sensibilização com OVA por via subcutânea no dorso do animal. A primeira sensibilização com OVA ocorreu no dia 0 (50 μg OVA + 5 mg Al(OH)_3 / 200 μl). Sete dias após foi feito o reforço (Booster) da sensibilização com OVA repetindo o procedimento da primeira etapa. Seguidos onze dias do reforço, no décimo sétimo dia, após um período de jejum máximo de quatro horas, foram iniciados os tratamentos com o fármaco controle, dexametasona, na dose de 10 mg/ kg e com os pulverizados das peles dos peixes SH e AM (500 mg/ kg) e salina (veículo) para o controle OVA, neste dia não houve desafio. Nos décimo oitavo, décimo nono e vigésimo dias, todos os tratamentos foram administrados (v.o.) para os animais em jejum, 1 h antes de cada evento de desafio via intranasal (in.) com ovalbumina em salina estéril (100 μg / 25 μL) nos animais anestesiados com ketamina 35 mg e xilazina 5 mg em 200 μl i.p..

Vinte e quatro horas após o último dia de desafio, no vigésimo primeiro dia, os animais foram eutanasiados e a traquéia foi exposta para canulação com auxílio de um tubo de polietileno para realização do lavado broncoalveolar com injeção de 1 mL de PBS/ EDTA 10 mM, pH 7,4 estéril recolhido na própria seringa utilizada para injeção. O lavado coletado foi encaminhado para posterior análise de teor protéico, contagem total e diferencial de leucócitos.

Figura 10 - Protocolo de Inflamação pulmonar alérgica



Fonte: (Adaptado de RODRIGUES et al., 2012).

Os animais foram sensibilizados por via subcutânea dorsal no dia 0 com 50 µg de OVA + Al(OH)₃ em 200 µL de salina estéril. O booster (reforço da sensibilização) foi realizado no 7º dia conforme o descrito na etapa anterior. Passados 17 dias da primeira sensibilização, os animais, em jejum prévio de 4 h, foram submetidos a um pré-tratamento por v.o. com o veículo (200 µL de salina) para o controle negativo, dexametasona 1 mg/ kg para o controle tratado (positivo) ou suspensão contendo 500 mg/ kg dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH para os grupos teste. Nos dias 18, 19 e 20, 1 h após cada tratamento, os animais foram anestesiados com 35 mg de ketamina e 5 mg de xilazina em 200 µL de salina estéril por via i.p., e desafiados por instilação com 100 µg de OVA em 25 µL de salina estéril. A eutanásia foi realizada 24 h após o último desafio para coleta do lavado broncoalveolar e sangue periférico.

3.2.4 Edema de pata com ovalbumina

Camundongos Balb/c foram previamente sensibilizados com 50 µg OVA+ 5 mg Al(OH)₃/ 200 µL por via subcutânea na região dorsal. Após 14 dias, os animais foram colocados em jejum por 4 h, em seguida foi feito o pré-tratamento com as suspensões contendo o pulverizado das peles dos peixes AM e SH na dose de 500 mg/ kg, salina (veículo) para o grupo controle negativo, ou dexametasona (10 mg/ kg) para o grupo controle positivo (v.o). Passada 1 h do tratamento, todos os animais foram desafiados com uma injeção na região subplantar da pata traseira direita com ovalbumina (50 µg/ 50 µL) e na pata esquerda com 50 µL de salina estéril 0,9%. Decorrentes: 30, 60, 120 e 180 minutos da indução com OVA, as aferições dos volumes das patas foram realizadas em pletismômetro (UGO BASILE®). As medidas foram baseadas nas variações de volume obtidas com a imersão da pata dos animais até o maléolo lateral do calcânhar. O delta (Δ) do volume das patas foi calculado pela diferença entre aferições das patas direita e esquerda (controle) e expressos em função do tempo.

3.2.5 Edema de pata induzido por histamina

Animais em jejum de 4h foram tratados com os pós das peles dos peixes AM e SH na dose de 500 mg/ kg, salina (veículo) ou com o anti-histamínico prometazina (10 mg/ kg) por via intramuscular (im.). Passada 1h do tratamento, todos os animais foram injetados na região subplantar da pata traseira direita com histamina (100 µg/ 50 µl) e na pata esquerda com 50 µl de salina estéril 0,9%. Decorrentes: 15, 30 e 60 minutos da indução com histamina, as aferições dos volumes das patas foram realizadas em pletismômetro (UGO BASILE®). As medidas foram baseadas nas variações de volume obtidas com a imersão da pata dos animais até o maléolo lateral do calcanhar. O delta (Δ) do volume das patas foi calculado pela diferença entre aferições das patas direita e esquerda (controle) e expressos em função do tempo.

3.3 Processamento de amostras

3.3.1 Processamento dos lavados pleurais, broncoalveolares e sangue periférico

Para avaliação da leucometria total dos lavados coletados nos ensaios de pleurisia inflamação pulmonar e do sangue periférico coletado da cauda dos camundongos, foram feitas as diluições em líquido de Turk, foram utilizadas as diluições nas proporções de 1:10 para lavados broncoalveolares ou 1:40 para lavados pleurais e sangue periférico. Foi pipetada uma alíquota de 10 µL da diluição para preenchimento do retículo da câmara de Neubauer, deixando em seguida, em repouso, para sedimentação das células. A contagem de todos os leucócitos dos quadrantes laterais da câmara foi realizada em microscópio binocular da marca NIKON ECLIPSE E100 LED no aumento de 40 x.

3.3.2 Contagem diferencial dos lavados pleurais, broncoalveolares e do sangue periférico dos animais utilizados nos modelos pleurisia e inflamação pulmonar alérgica

Para preparação da lâmina dos lavados, o número de células totais foi para a proporção de 10^5 células/ mL em 100 µL de solução final, seguindo para citocentrífuga ALB 12 INBRAS para rotação por 49,1 x g durante 5 minutos. As lâminas foram deixadas em repouso para secagem e, em seguida, coradas.

O esfregaço foi realizado ao aplicar uma gota de sangue da ponta da cauda dos camundongos anestesiados sobre a extremidade da lâmina e com o auxílio outra lâmina, inclinada em 45°, foi feita a extensão da gota, deslizando uniformemente até a outra extremidade da lâmina, formando uma película sobre a lâmina de vidro. Os esfregaços aguardaram a secagem completa para seguir para etapa de coloração.

A coloração de todas as lâminas foi realizada pelo método Panótico de Pappenheim (May-Gruenwald-Giemsa), com o kit comercial Panótico Rápido da marca Laborclin, por meio de imersões de 1 minuto nas 3 soluções do kit, na sequência recomendada pelo fabricante: solução de triarilmetano a 0,1%, em seguida solução de xantenos a 0,1% e na solução de tiazinas a 0,1%, finalizando com lavagem em água destilada e secagem ao ar.

Foram contados 100 leucócitos por cada lâmina, utilizando contador mecânico com a finalidade de identificação das proporções percentuais de cada tipo (mononucleares, neutrófilos e eosinófilos). Os valores percentuais foram aplicados à contagem total dos lavados ou sangue total, para quantificação dos tipos celulares em cada amostra.

3.3.3 Análise de proteínas totais dos lavados

Foram retirados 5 µL dos sobrenadantes dos lavados e transferidos para placa de 96 poços de fundo chato. A curva padrão de proteína foi feita com albumina de soro fetal bovino (BSA) em quatro pontos de concentração (1,4; 0,7; 0,35 e 0,17 mg/ mL) utilizando o PBS para diluições e para o branco. Em seguida adicionou-se 245 µL do Reagente de Bradford (Sigma – B6916) (BRADFORD, 1976) em todos os poços. Após 15 minutos em abrigo da luz a absorbância foi mensurada em leitor de microplaca SpectraMax M5/ Molecular Devices a 595 nm, os valores foram processados em software SoftMax Pro 5.3.

3.3.4 Quantificação dos mediadores inflamatórios

A quantificação dos mediadores inflamatórios IL-5, Eotaxina-1 (CCL11) e RANTES (CCL5) foi realizada nos lavados pleurais recuperados dos animais utilizados em ensaio de pleurisia, 24hs após estimulação com OVA (12,5 µg/ cavidade). Os níveis destas citocinas foram avaliados pelo teste ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”), usando anticorpos marcados da marca R&D Systems. Na primeira etapa (coating) os anticorpos de captura purificados anti-IL-5, anti-CCL11 e anti-CCL5 foram adicionados, individualmente, em placas de 96 poços da marca MaxiSorp, junto a 50µL/ poço de tampão

de cobertura. Após 24 h de incubação a 4° C, as placas foram lavadas em duas etapas com 200 µL/ poço de PBS/ Tween. O bloqueio foi realizado com PBS/ BSA 1%, seguido de 1 h de incubação em temperatura ambiente e quatro etapas de lavagem com PBS/ BSA 1%. Na sequência, juntamente com 50 µL das amostras, foi adicionado tampão PBS/BSA 1% contendo diluição seriada com quantidades conhecidas da citocina de interesse, para gerar curva padrão. Novamente foi realizada a incubação a 4° C por 24 h. Para detecção, foi adicionado anticorpo conjugado a biotina em 100 µL/ poço da solução de PBS-BSA 1%. Decorrida 1 h, novamente foram realizadas quatro etapas de lavagem com PBS/ Tween. Em seguida adicionou-se 1: 500 da enzima estreptoavidina conjugada à peroxidase diluída em 50 µL de PBS-BSA 1% após 30 minutos foi realizada nova lavagem com PBS/ Tween em seis etapas. Finalmente foi adicionado como substrato o tampão perborato (12,15 mg/ mL) com OPD (0,5 mg/ ml) em 100 µL/ poço de ácido sulfúrico 2M. A leitura da placa foi realizada em fluorímetro SpectraMax[®]M5/ MolecularDevices a 490nm e os valores processados em software SoftMax Pro 5.3.

3.4 ANÁLISE DE LINFONODOS DOS ANIMAIS DO ENSAIO DE EDEMA DE PATA COM OVA

3.4.1 Preparo dos homogenatos dos linfonodos para avaliação das populações de linfócitos T e linfócitos T ativados para avaliação por citometria de fluxo

Os camundongos utilizados em ensaio de edema de pata induzido por OVA retornaram ao biotério onde permaneceram por mais 72 h para expansão clonal e acumulação de linfócitos envolvidos no processo inflamatório em linfonodo poplíteo da pata direita, localizado no fluxo celular mais próximo ao local da realização do estímulo com OVA. Os animais foram então eutanasiados para a coleta do referido linfonodo. Os órgãos foram pesados, em seguida foi realizada a dissociação mecânica em placa de Petri e homogeneização em 500 µL de tampão PBS, pH 7,2. O homogenato obtido seguiu para contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. Em seguida foi realizado o ajuste da quantidade de células para a ordem de 10^5 células/ mL para marcação e avaliação em citometria de fluxo.

3.4.2 Avaliação do efeito da pele dos peixes porco sobre a população de células T ativadas por citometria de fluxo

Uma alíquota de 50 μ L dos homogenatos dos linfonodos foi utilizada para marcação de células T e células T ativadas com os anticorpos monoclonais anti CD3 conjugado ao fluoróforo PerCP-Cy™ 5.5 e o anticorpo monoclonal anti CD25 conjugado ao fluoróforo FITC, ambos da marca EXBIO (T9-578-C100) e (1F-614-C100) respectivamente. As amostras foram ressuspensas em 500 μ L de PBS azida 0,1% e as suspensões celulares foram avaliadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). A análise por citometria de fluxo permitiu a aquisição de parâmetros morfológicos referentes aos desvios da luz provocados pelo tamanho da célula, corte transversal, provocado pelo desvio frontal (Forward Scatter: FSC) e pela granulosidade celular, referente ao índice de refração dos grânulos da célula adquiridos no Side Scatter, (SSD). Além destes parâmetros, a marcação dos indicadores fenotípicos acima descritos permitiu a diferenciação de células T CD3⁺ e células T ativadas que passam a expressar o indicador fenotípico de ativação, apresentando o fenótipo CD3⁺/CD25⁺.

3.5 Cultura de células

As células da linhagem RBL-2H3 foram adquiridas do Laboratório de Inflamação no IOC – FIOCRUZ e cultivadas em meio DMEM Dulbecco's modified Eagle's (Sigma – R8755) contendo 100 U/ mL de penicilina e 0,1 mg/ mL de estreptomicina, suplementado com 15% de SFB.

As células da linhagem de macrófagos murinos J774-A1 foram adquiridas do Laboratório de Farmacologia Aplicada em Farmanguinhos - FIOCRUZ e cultivadas em DMEM (Sigma – R8755) contendo os antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações de 100 U/ mL e suplementado com 10% SFB.

3.5.1 Ensaio de β -Hexoaminidase com linhagem basofílica RBL-2H3 in vitro

A avaliação da degranulação de RBL-2H3 foi realizada pela da quantificação da taxa de liberação de β -hexosaminidase (β -hex) no sobrenadante da cultura, conforme descrito em HAN et al., 2009. Para realização do ensaio, células em confluência foram tripsinizadas com uma solução a 0,125% (Gibco BRL) e EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co.), 1,25 x

10⁵ células/poço foram semeadas em placas de 48 poços. Para avaliação de degranulação, as células foram sensibilizadas com IgE específica anti-dinitrofenol (DNP) (1 µg/ mL, Sigma Chemical Co.) e incubadas por 20 h. Após lavagem, as células foram incubadas com 20 µL da diluição do pó da pele dos peixes e produtos da hidrólise (pellet e sobrenadante) nas concentrações de 400 µg/ mL, 200 µg/ mL, 100 µg/ mL, 50 µg/ mL em meio tyrode durante 1 h. Após esse período, as células foram estimuladas com DNP-BSA (10 ng/mL) durante 45 min. O sobrenadante foi recolhido e as células foram lisadas com 20 µL de Triton X-100, 1%. Em seguida, 10 µL do sobrenadante da cultura e do lisado celular foram incubados separadamente com 40 µL do substrato (p-nitrofenil-B-D.2-acetamido-2-deoxi-glicopiranosídeo 4 mM em tampão de citrato de sódio, pH 4,5). A reação foi interrompida com a adição de 150 µL de glicina 0,2 M. A quantidade de β-hexosaminidase no sobrenadante foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 405 nm. A liberação de β-hexosaminidase foi expressa como percentagem da β-hexosaminidase total presente na célula.

3.5.2 Avaliação da capacidade inibitória da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos murinos J774-A1 por meio do método de Griess *in vitro*

As células J774-A1 foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 1,0 x 10⁵/ poço (50 µL) em triplicata para os controles e para todas as concentrações de tratamentos. Na sequência, foi feito um pré-tratamento com diluições da pele dos peixes AM e SH e dos materiais hidrolisados (pellet e sobrenadante) nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/ mL, e como controle farmacológico foi utilizado o diclofenaco (Sigma D6899106) na concentração de 50 µg/ mL e a dexametasona (Sigma D175,6-1G) na concentração de 20 pg/ mL. A placa foi incubada por 1 h em estufa com 5% CO₂ a 37° C. O volume final das células com o tratamento foi de 100 µL. Ao final de 1 h foi acrescida uma solução de 100 µL do meio de cultura contendo o estímulo lipopolissacarídeo (LPS) de *E.coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µg/ mL em cada poço. Em seguida, a placa retornou à estufa à 5% CO₂/ 37° C onde permaneceu por 24 h para posterior avaliação. Para realização da avaliação do teor de nitrito presente no sobrenadante da cultura, foi necessário transferir 100 µL do sobrenadante de cada poço para outra placa. Em seguida foi feita uma curva padrão contendo NO₂⁻ em concentrações conhecidas (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µM) em volume final de 100 µL. Para leitura foi adicionado a cada poço 100 µL dos reagentes de Griess na proporção de 1(Reagente A):1(Reagente B), preparado imediatamente antes do uso. A leitura foi realizada

em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando o software SoftMax Pro[®] versão 5,0 – Molecular Devices. Os resultados obtidos foram expressos em concentração μM de NO_2^- .

3.5.3 Viabilidade celular pelo método da resazurina (ALAMARBLUE[®])

As células das culturas de Macrófagos murinos J774-A1 e da linhagem basofílica RBL-2H3 foram distribuídas em placas individuais de 96 poços na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/ poço (100 μL). Cada grupo, em triplicata, recebeu 100 μL das substâncias teste nas mesmas concentrações estabelecidas para os ensaios de atividade *in vitro*. Foi feita uma curva de densidades de 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 $\times 10^5$ células para uso como curva padrão, de modo a estabelecer o percentual de viabilidade celular mediante a comparação com a produção de resorfurina obtidas de células viáveis nas diferentes densidades e valores das leituras dos poços submetidos aos tratamentos teste. Em seguida as placas foram colocadas na estufa com 5% CO_2 a 37° C. Após 20 hs as placas receberam 20 μL do reagente resazurina e retornaram à estufa para incubação por mais 4 h. Após esse período, foi realizada a leitura em fluorímetro, na faixa de excitação em 555 nm e emissão em 585 nm, utilizando o software SoftMax Pro[®] versão 5.0 – Molecular Devices. Os resultados foram expressos em valores percentuais \pm erro padrão comparado ao controle sem tratamento.

3.6 Avaliação química preliminar

3.6.1 Quantificação proteica

A determinação da quantidade de proteínas totais foi realizada pelo método Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O reagente foi preparado a partir de 100mg de Coomassie[®] Azul Brillhante G-250 solubilizado em 50 ml de etanol 95% e 100 ml ácido fosfórico 85%. A solução foi diluída para um volume final de 1L, filtrada e utilizada para a dosagem de proteínas.

No preparo das amostras, 1mg do pulverizado das peles dos peixes e dos materiais liofilizados provenientes da hidrólise enzimática (sobrenadante e pellet) foram solubilizados em 1mL de água destilada. Destas diluições, 10 μL das amostras foram adicionados em 990 μl do reagente de Bradford e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro à 595 nm. Esta metodologia se baseia na absorvância máxima de uma solução ácida de Azul de Comassie que se liga às proteínas que possuem aminoácidos

com cadeias laterais básicas ou aromáticas. Para a determinação da quantidade de proteínas totais das amostras, foi feita uma diluição seriada do padrão BSA de 1000 a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As corridas eletroforéticas foram realizadas em géis de poliacrilamida contendo o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando as condições descritas por Laemmli (1970) em um sistema de eletroforese Mini-protean II (Bio-Rad). O perfil proteico do pulverizado da pele dos peixes foi analisado em géis de 10% e a avaliação dos hidrolisados em 15% de acrilamida. Cerca de 1 mg das amostras foram diluídas em tampão de amostra, preparado a partir de 3 mg de Azul de bromofenol diluídos em 1,2 mL de 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 1,0 mL de dodecil sulfato de sódio à 20% e 1,0 mL de glicerol. Para o uso, a solução foi diluída 6 vezes e em condições redutoras foi adicionado o agente redutor de pontes dissulfeto β -mercaptoetanol, na concentração final de 10%.

Antes de serem aplicadas no gel, as amostras passaram por um tratamento prévio de desnaturação (5 min a 100°C). A corrida eletroforética ocorreu com um diferencial de potencial de 100 volts durante cerca de 3 h e ao final as bandas foram reveladas com azul de Coomassie® Azul Brilhante R-250.

3.7 Análise estatística

Os resultados dos ensaios *in vivo* foram apresentados como médias \pm erro padrão das médias envolvendo seis ou mais animais. Os grupos tratados foram comparados com o grupo controle por meio do teste “t” de Student. As avaliações *in vitro* e os dados dos ensaios de toxicidade oral aguda foram tratados pela análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Student-Newman-Keus. A ferramenta empregada para fins estatísticos em todos os testes foi o software GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Pleurisia com ova

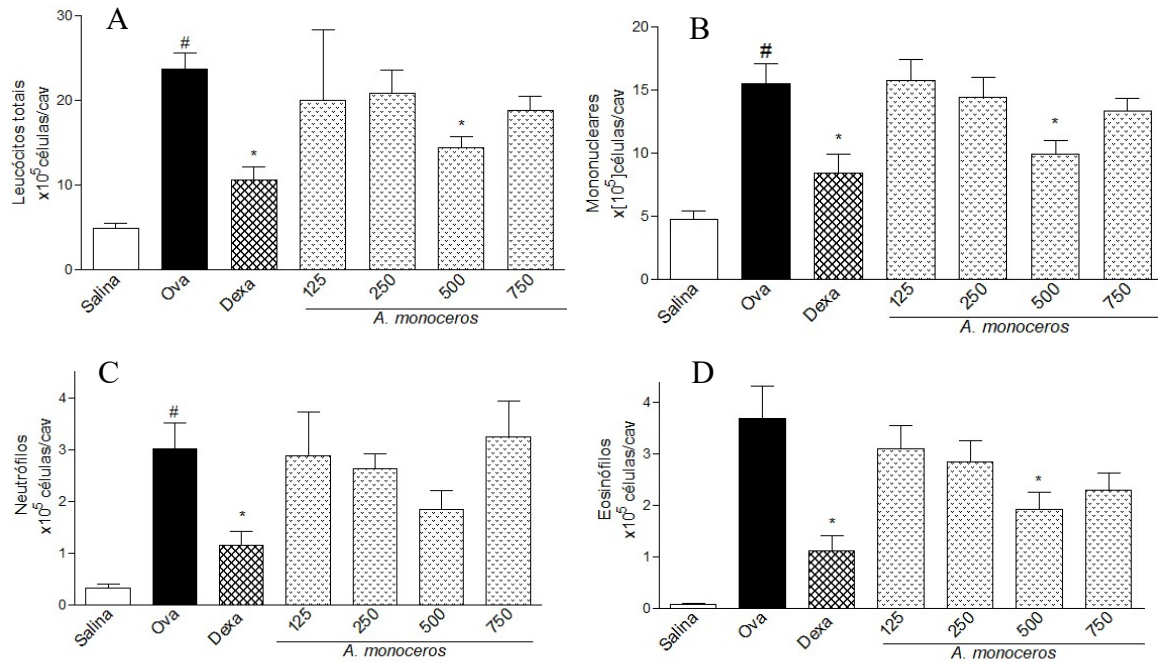
Utilizamos inicialmente o modelo de pleurisia alérgica, a fim de obter a melhor dose para as futuras avaliações da atividade antialérgica do pulverizado da pele dos peixes. Neste ensaio os animais previamente sensibilizados com OVA, divididos em grupos de $n \geq 6$ receberam tratamento com 125, 250, 500 e 750 mg/ kg dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH. Passado o período de 1 h, foi realizado o desafio i.pl. com OVA. Após 24 h, foi feita a eutanásia e a coleta do lavado.

4.1.1. Curva dose resposta com o pulverizado da pele do peixe *Aluterus monoceros*

A menor dose com atividade antialérgica do pulverizado da pele do peixe AM foi a dose de 500 mg/kg. Como é possível verificar na figura 11A, o tratamento com 10 mg/ kg de dexametasona reduziu o número de células totais no lavado pleural em aproximadamente 55% ($10,56 \pm 1,64 \times 10^5$ células/ cavidade (cav.), ao passo que com a administração de 500 mg/ kg do pulverizado da pele do peixe AM foi possível obter redução de aproximadamente 40% do infiltrado inflamatório total na cavidade pleural ($14,41 \pm 1,26 \times 10^5$ células/ cav., $n > 10$), frente ao grupo estimulado ($23,72 \pm 1,91 \times 10^5$ células/ cav., $n > 10$).

A figura 11D apresenta a contagem de eosinófilos, o principal grupo celular implicado nos processos alérgicos, nesta figura, o grupo controle negativo apresentou contagem de $3,69 \pm 0,64 \times 10^5$ células/ cavidade, $n > 10$, o grupo controle positivo (dexametasona) mostrou redução do infiltrado eosinofílico em 69% ($1,13 \pm 0,29$ cav., $n > 10$), e o grupo que recebeu a dose de 500 mg/ kg da pele do peixe AM mostrou reduzir em 48% a contagem de eosinófilos nos lavados pleurais ($1,93 \pm 0,34 \times 10^5$ células/ cavidade, $n > 10$). Com a dose de 500 mg/ kg foi possível observar redução neutrofílica de aproximadamente 40% e de 36% para a população de mononucleares (figuras 11C e 11B, respectivamente). Escolhemos esta dose de 500 mg/ kg para dar prosseguimento as avaliações seguintes, pela redução do infiltrado leucocitário obtida. As doses de 125 mg/ kg e 250 mg/ kg não apresentaram significância estatística na comparação com o grupo estimulado. A dose de 750 mg/ kg foi inviabilizada em função de dificuldades durante administração da suspensão do pó da pele do peixe, pois seus fragmentos em maior concentração acarretavam o entupimento da cânula gastroesofágica.

Figura 11 - Efeito de diferentes doses da pele do peixe *A.monoceros* no modelo de pleurisia alérgica induzida por ovalbumina



Fonte: (Do autor, 2015).

Animais foram tratados 1h antes do desafio com ova (12,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ – i.pl.). Após 24h, os animais foram eutanasiados para obtenção do lavado pleural e contagem de células presentes no lavado: leucócitos totais (A), mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), $n \geq 6/\text{grupo}$. O sinal (*) indica a significância estatística entre os grupos: estimulados e tratados (Dexta e pulverizados) e estimulado e não tratado (OVA), ($p \leq 0,05$). O marcador (#) indica significância estatística entre os grupos desafiados com ovalbumina e controle salina ($p \leq 0,05$).

4.1.2. Curva dose resposta com a pele do peixe SH

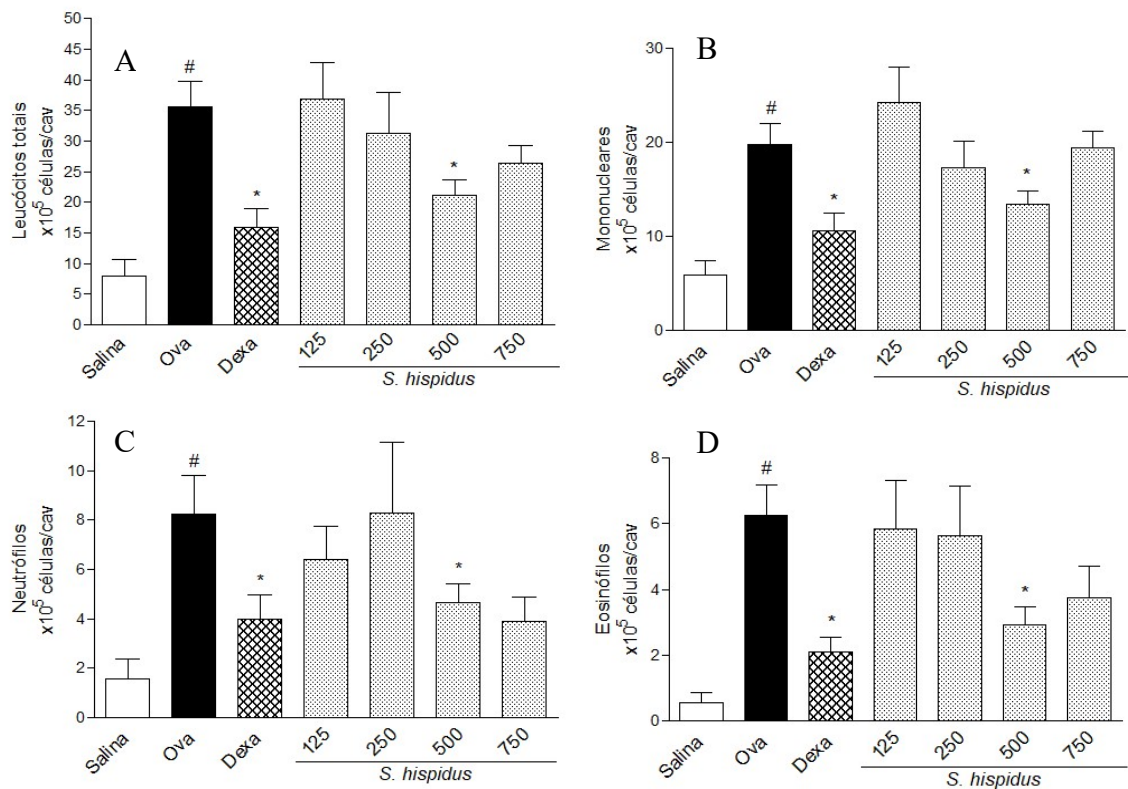
Relativo ao efeito da pele do peixe SH sobre a resposta inflamatória induzida por OVA na cavidade pleural, obtivemos padrão semelhante à resposta verificada com o tratamento utilizando a pele do peixe AM. A dose de 500 mg/ kg foi a menor dose capaz de produzir redução de 40% do infiltrado leucocitário total nos lavados pleurais ($21,15 \pm 2,48 \times 10^5$ células/ cav., $n > 10$) (figura 12A), comparada a 55% como obtido com 10 mg/ kg de dexametasona ($15,9 \pm 3,10 \times 10^5$ células/ cav., $n > 10$), versus o grupo estimulado e não tratado ($35,61 \pm 4,21 \times 10^5$ células/ cavidade, $n > 10$).

Quanto ao acúmulo eosinofílico apresentado na figura 12D, o pré-tratamento com 500 mg/ kg da pele do peixe SH possibilitou redução de 53% ($2,92 \pm 0,54 \times 10^5$ células/ cav.,

n>10), comparado ao obtido 66% com o fármaco de referência ($2,10 \pm 0,45 \times 10^5$ células/ cav., n>10), frente ao grupo induzido com OVA ($6,26 \pm 0,94 \times 10^5$ células/ cavidade, n>10).

Foi verificada para esta mesma dose, uma redução do infiltrado neutrofílico de 43% e redução de 31% na contagem de mononucleares nos lavados pleurais, conforme o apresentado nas figuras 12C e 12B respectivamente. Em função da resposta obtida a dose de 500 mg/ kg, esta foi selecionada para a continuidade das avaliações. Para os tratamentos com as doses de 125 mg/ kg e 250 mg/ kg não houve estatística ($p > 0,05$) na comparação com o grupo controle estimulado. A dose de 750 mg/ kg foi inviabilizada em função de dificuldades durante administração da suspensão do pó da pele do peixe, pois seus fragmentos em maior concentração acarretavam o entupimento da cânula gastroesofágica.

Figura 12 - Efeito de diferentes doses da pele do peixe *S. hispidus* no modelo de pleurisia alérgica induzida por ovalbumina



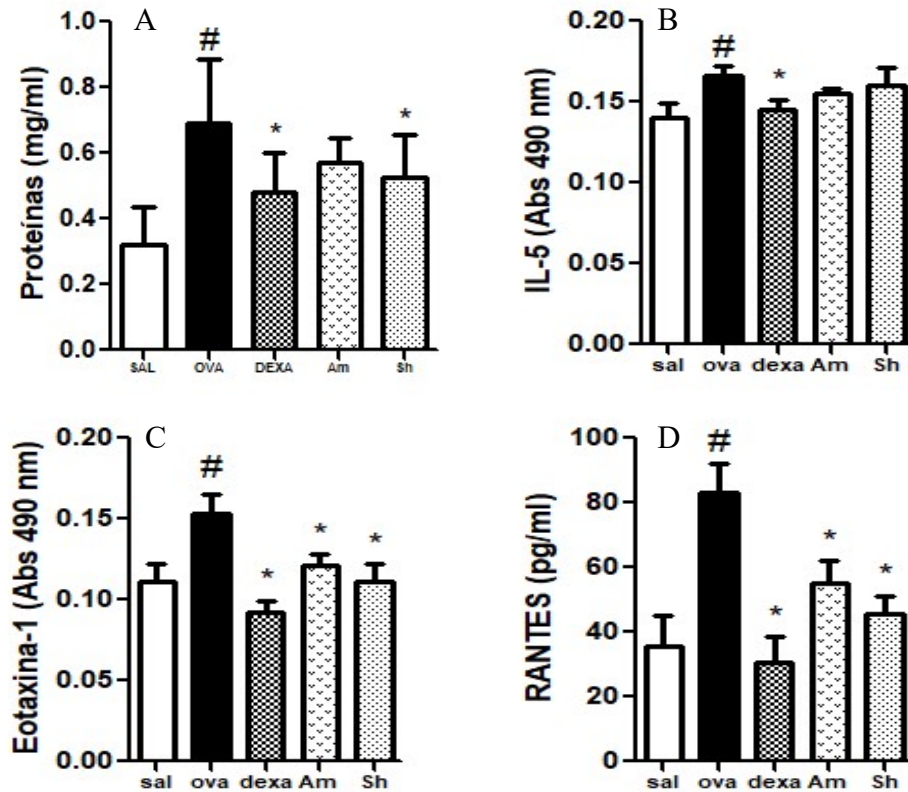
Fonte: (Do autor, 2015).

Animais foram tratados 1h antes do desafio com ova ($12,5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ – i.pl.). Após 24h, os animais foram eutanasiados para obtenção do lavado pleural e contagem de células presentes no lavado: leucócitos totais (A), mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), $n \geq 6$ /grupo. O sinal (*) indica a significância estatística entre os grupos: estimulados e tratados (Dexa e pulverizados) e estimulado e não tratado (OVA), ($p \leq 0,05$). O marcador (#) indica significância estatística entre os grupos desafiados com ovalbumina e controle salina ($p \leq 0,05$).

4.1.3. Dosagem de proteína pelo método de Bradford e de mediadores inflamatórios no lavado pleural

Com o intuito de avaliar se o tratamento com as suspensões dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH poderiam provocar alterações na quantidade de proteínas totais e no acúmulo dos mediadores inflamatórios implicados nestes processos, o próximo passo foi realizar a dosagem de proteínas totais nos lavados pleurais pelo método de Bradford, bem como a citocina IL-5 e as quimiocinas atraentes de eosinófilos CCL11 (eotaxina-1) e CCL5 (RANTES). Com essas avaliações, vimos que não houve redução significativa do exsudado pleural diante do tratamento com a pele do peixe AM ($p > 0,05$), embora seja possível observar alguma redução, conforme a figura 13A. Referente ao tratamento com a pele do peixe SH, houve diminuição significativa aproximadamente 25% do exsudado protéico presente nos lavados pleurais ($0,690 \pm 0,06$ mg/ml, $n=10$ para o grupo estimulado não tratado (OVA), frente a $0,52 \pm 0,04$ mg/ml, $n=10$, para o grupo pré tratado com 500 mg/ kg do pulverizado da pele do peixe SH). A figura 13B mostra que não houve alteração significativa da produção de IL-5 entre os grupos veículo e pré-tratados com as peles dos peixes. Por outro lado, houve diminuição da acumulação de eotaxina-1 e RANTES nos lavados pleurais, conforme o ilustrado na figura 13C e 13D. De acordo com os resultados apresentados, na figura 13C houve redução de 21% do acúmulo de eotaxina-1 no lavado pleural do grupo pré-tratado com a pele do peixe AM enquanto, no lavado pleural do grupo pré-tratado com a pele do peixe SH, a redução foi de 28% quando comparados ao grupo estimulado/ não tratado. Na figura 13D vimos uma restrição nos teores de RANTES encontrados, de 34% ao comparar os animais que receberam a suspensão do pó da pele do peixe AM e de 45% quando se tratavam dos animais que receberam a suspensão do pó da pele do peixe SH, com os animais que foram estimulados e não tratados.

Figura 13 - Efeito do tratamento oral com as peles de peixe-porco dos peixes AM e SH no na quantidade de proteínas totais e na produção de IL-5, CCL11 (Eotaxina-1), e CCL5 (RANTES) nos lavado pleurais de animais desafiados com OVA.



Fonte: (Do autor, 2017).

Os níveis de proteína foram determinados pelo método de Bradford (em A) e por meio da técnica de ELISA adosagemda interleucina IL-5 (B) e quimiocinas Eotaxina-1 (C) e RANTES (D) no lavado pleural recolhido 24h após desafio. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), $n \geq 6$ /grupo. O sinal (*) indica a significância estatística entre os grupos: estimulados e tratados (Dexa e pulverizados) e estimulado e não tratado (OVA), ($p \leq 0,05$). O marcador (#) indica significância estatística entre os grupos desafiados com ovalbumina e controle salina ($p \leq 0,05$).

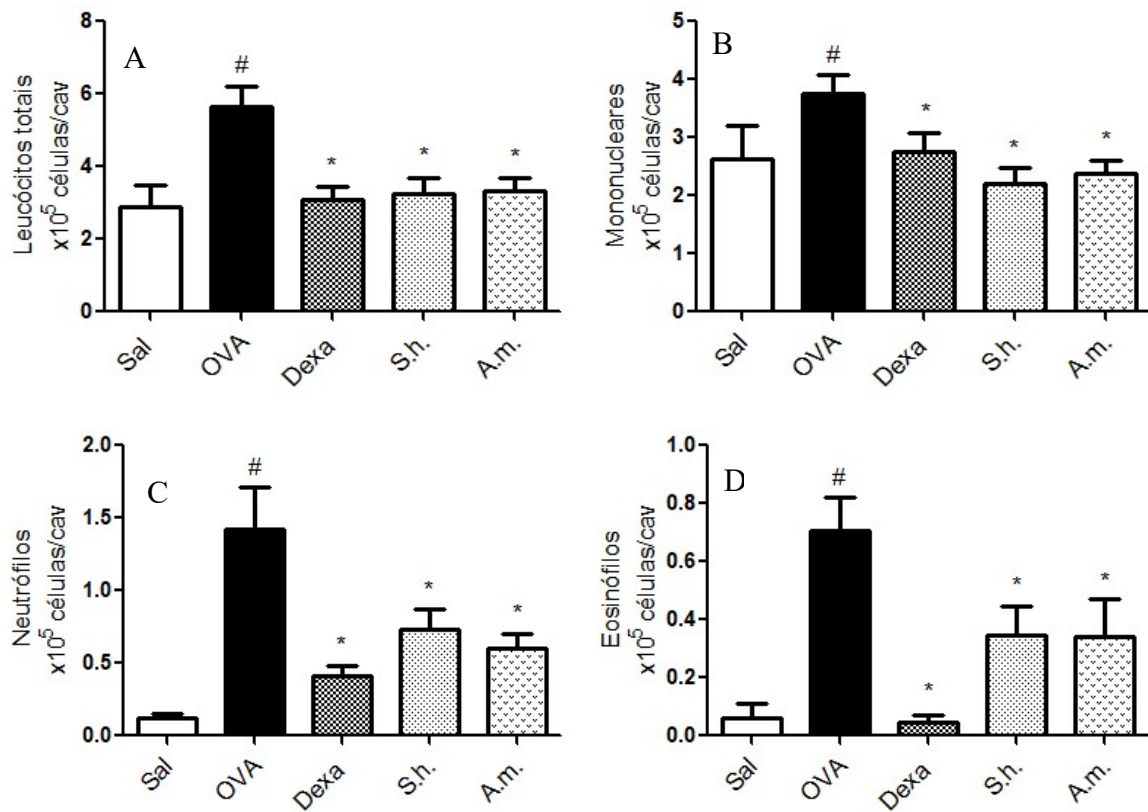
4.2 Inflamação pulmonar alérgica

4.2.1 Avaliação da celularidade nos lavados broncoalveolares

Na avaliação apresentada na figura 14 as contagens totais e diferenciais revelaram que o tratamento com os pulverizados das peles de AM e SH, 1 h antes do desafio (in.), foram capazes de reduzir o infiltrado leucocitário total no lavado broncoalveolar de forma equivalente (figura 14A) em torno 42% para ambas as peles ($3,31 \pm 0,38$ células/ cavidade, para grupo tratado com a pele AM; $3,26 \pm 0,44$ células/ cavidade para o tratado com a SH e $5,65 \pm 0,56$ células/ cavidade, para o grupo estimulado, $n > 10$) obtendo resultado similar àdexametasona que promoveu inibição de 45% do influxo ($3,09 \pm 0,36$ células/ cavidade,

n>10). A redução eosinofílica é apresentada na figura 14D, a dexametasona reduziu em 93% o infiltrado, atingindo níveis basais ($0,05 \pm 0,02$ células/cav., n>10), já os tratamentos avaliados promoveram redução em torno de 52% para ambos os pulverizados ($0,71 \pm 0,12$ células/ cav., para o grupo estimulado (OVA), $0,338 \pm 0,13$ células/ cav., para grupo tratado com AM e $0,35 \pm 0,09$ células/ cav., para o grupo tratado com SH, n>10). Quanto a população de neutrófilos apresentada na figura 14C presentes no lavado broncoalveolar, o pulverizado AM inibiu a acumulação em 57% dos neutrófilos ao passo que a pele do peixe SH foi capaz de inibir 49% da acumulação neutrofílica.

Figura 14 - Efeito do tratamento com 500 mg/kg (v.o.) da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* sobre o infiltrado inflamatório no lavado broncoalveolar



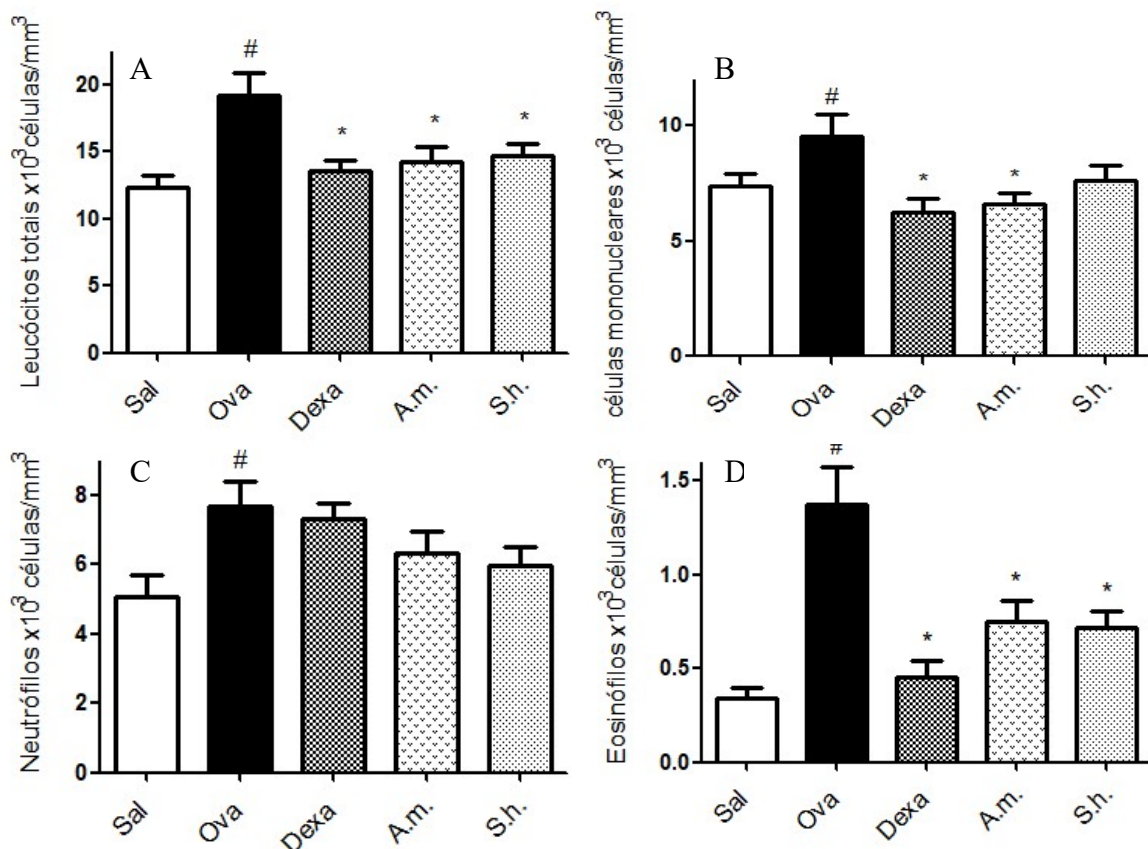
Fonte: (Do autor, 2017).

A pele seca e triturada dos dois peixes foi administrada durante 4 dias consecutivos. O desafio com ovalbumina (via intranasal – 100 µg/25 µl - in.) foi realizado a partir do segundo dia de tratamento, 1h antes de cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados para realização do lavado broncoalveolar e contagem de células presentes: leucócitos totais (A), mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), n>10/grupo. O sinal (*) indica a significância estatística entre os grupos: estimulados e tratados (Dexa e pulverizados) e estimulado e não tratado (OVA), ($p \leq 0,05$). O marcador (#) indica significância estatística entre os grupos desafiados com ovalbumina e controle salina ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Leucometria total e diferencial do sangue dos animais utilizados no protocolo de inflamação pulmonar.

Nesta etapa investigamos os perfis de celularidade do sangue periférico dos animais submetidos ao protocolo de inflamação pulmonar, tratados e não tratados com os pulverizados. Utilizamos o sangue da cauda dos animais para contagem leucocitária total e diferencial e verificamos uma redução significativa ($p \leq 0,05$) em torno de 25% da leucometria total para os animais tratados com ambos os pulverizados, conforme o apresentado na figura 15A ($14,26 \pm 1,13 \times 10^3$ células/ mm^3 obtidas com o tratamento AM e $14,72 \pm 0,93 \times 10^3$ células/ mm^3 com a pele SH contra $19,25 \pm 1,64 \times 10^3$ células/ mm^3 do grupo controle (OVA), $n > 10$). A depleção eosinofílica no sangue periférico, conforme o observado na figura 15D, foi equivalente entre os tratamentos com as duas peles AM e SH ($0,75 \pm 0,11 \times 10^3$ células/ mm^3 da pele do peixe AM e $0,72 \pm 0,09 \times 10^3$ células/ mm^3 da pele do peixe SH, contra $1,376 \pm 0,20 \times 10^3$ células/ mm^3 dos animais estimulados não tratados, $n > 10$) representando redução de 45% e 48% para os pulverizados das peles dos peixes AM e SH, respectivamente.

Figura 15 - Efeito do tratamento com 500 mg/kg da pele dos peixes sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em câmara de Neubauer.



Fonte: (Do autor, 2017).

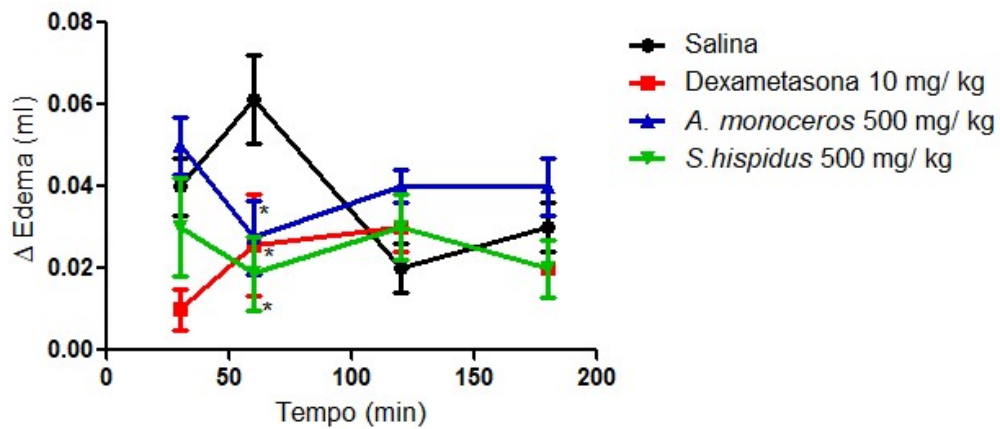
O sangue periférico foi obtido da cauda dos camundongos utilizados no ensaio experimental de inflamação pulmonar alérgica na diluição de 1:100 em Turk. A contagem diferencial foi obtida por meio de esfregaço utilizando o método da gota espessa e coloração GIEMSA. São apresentados na figura os valores obtidos de leucócitos totais (A), mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D) presentes no sangue periférico. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), $n > 10$ /grupo. O sinal (*) indica a significância estatística entre os grupos: estimulados e tratados (Dexa e pulverizados) e estimulado e não tratado (OVA), ($p \leq 0,05$). O marcador (#) indica significância estatística entre os grupos desafiados com ovalbumina e controle salina ($p \leq 0,05$).

4.3 Efeito antiedematogênico das peles dos peixes

4.3.1 Efeito do tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH sobre o edema de pata induzido por OVA

Para fins de avaliação do efeito antiedematogênico dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH realizamos ensaios de edema de pata induzido com ovalbumina, em animais préviamente sensibilizados. As aferições foram feitas em pletismômetro nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos com a finalidade de estudar a variação da permeabilidade vascular produzida com os diferentes tratamentos. Os resultados apresentados na figura 16 mostram que o pré-tratamento com os pulverizados das peles dos peixes foi capaz de inibir significativamente o edema de pata, após 1h da realização do estímulo com o alérgeno (momento de maior expressão do edema). A pele do peixe AM inibiu o edema de pata em 55%, efeito próximo ao produzido pelo fármaco de referência, a dexametasona, inibiu 58% da formação do edema, ao passo que o pré-tratamento com a pele do peixe SH produziu inibição de 69%, obtido pela média \pm erro padrão do delta entre as patas estimulada (direita) e salina (esquerda).

Figura 16 - Efeito do tratamento com a pele dos peixes sobre o edema de pata induzido por ovalbumina



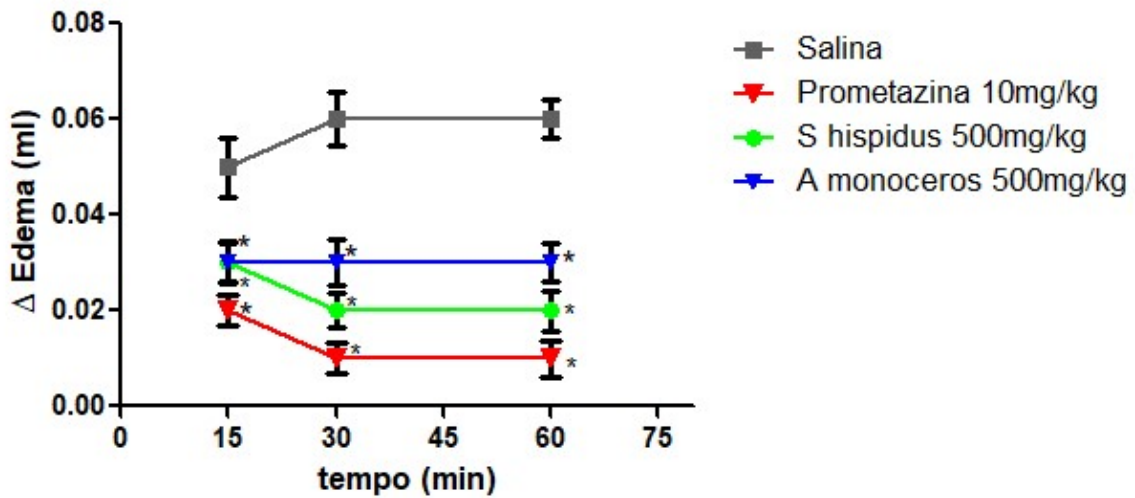
Fonte: (Do autor, 2017).

A avaliação do edema foi obtida pela média \pm erro padrão das diferenças (Δ) entre as patas traseiras dos camundongos. A direita foi estimulada com histamina 50 μ g/50 μ l e a esquerda foi o controle e recebeu 50 μ l de salina estéril. Os grupos tratados receberam dexametasona (10 mg/ kg; i.m.) como controle farmacológico, ou 500 mg/ kg da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* triturada em suspensão salina por gavagem (v.o.), 1 h antes da injeção intraplantar com ovalbumina. Cada ponto representa a média \pm EPM (erro padrão da média) de $n \geq 7$ /grupo. O símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Efeito do tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH sobre o edema de pata induzido por histamina

Partimos para avaliação do envolvimento de mediadores iniciadores do processo, para fins de investigar indícios de mecanismos de ação relacionados ao efeito anti inflamatório da pele dos peixes. Assim sendo, realizamos o ensaio de edema de pata induzido por histamina por meio da injeção (i.pl.) de 100 μ g na pata direita e salina na esquerda. Utilizamos prometazina como fármaco anti-histamínico de referência. E avaliamos o efeito anti edematogênico 15, 30 e 60 minutos após o estímulo com histamina. A pele do peixe AM mostrou 41% de redução do edema no primeiro momento de avaliação, atingindo seu patamar máximo de 50%, 30 minutos após a injeção de histamina. Entretanto a pele do peixe SH se mostrou mais eficaz, reduzindo 48% do edema na primeira avaliação com 15 min e chegando a 67% de contenção edematogênica no segundo momento de avaliação conforme o observado na figura 17. A contenção do edema induzido por histamina atingiu valor próximo ao observado com a prometazina de 66,7% no primeiro momento e 74,5%, no segundo estágio de avaliação. Nesta avaliação foi verificada a contenção mais intensa do exsudato para a pele do peixe SH.

Figura 17 - Efeito do tratamento com a pele dos peixes sobre o edema de pata induzido por histamina



Fonte: (Do autor, 2015).

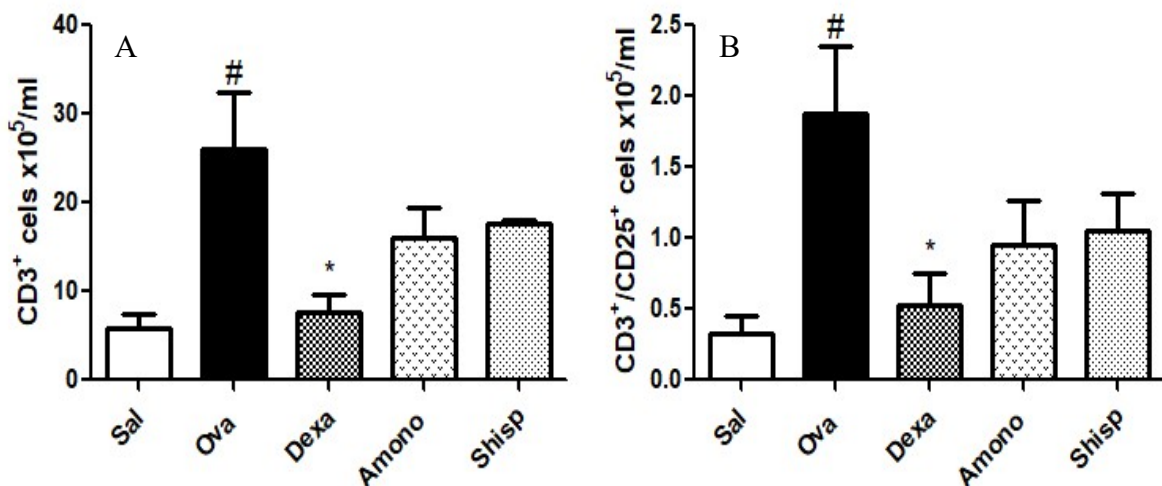
A avaliação do edema foi obtida pela média \pm erro padrão das diferenças (Δ) entre as patas traseiras direita (estimulada com histamina 100 μ g/50 μ l) e esquerda (controle: 50 μ l de salina estéril). Os grupos tratados receberam prometazina (10 mg/kg; i.m.) como controle farmacológico, ou 500 mg/kg da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* triturada em suspensão salina por gavagem (v.o.), 1h antes da injeção intraplantar com histamina. Cada ponto representa a média \pm EPM (erro padrão da média) de n>6/grupo. O símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de ($p \leq 0,05$).

4.3.3 Efeito do tratamento com o pulverizado da pele dos peixes sobre a ativação de células T

Esta avaliação de linfócitos T foi feita a partir da coleta e dissociação de linfonodo poplíteo dos animais usados no ensaio de edema de pata com OVA. Após indução da reação antígeno específica em animais pré-sensibilizados, e passadas 72hs, avaliamos fenotipicamente as células TCD3⁺ e TCD3⁺/CD25⁺ presentes no linfonodo drenante da pata estimulada, situada no trajeto mais próximo do local da indução. O objetivo desta etapa foi entender se os pulverizados das peles dos peixes AM e SH poderiam atuar na acumulação de células T e células T ativadas. Os resultados da figura 18 mostraram redução do quantitativo de células TCD3 nos homogenatos de 38% e 33% para os tratamentos com as peles dos peixes AM e SH, respectivamente, para o tratamento com o fármaco de referência, dexametasona, foi observada a redução de 71% de células TCD3, conforme o observado na figura 18A. Referente à população de células TCD3⁺/CD25⁺ (figura 18B) presentes nos homogenatos dos linfonodos dos animais que receberam o tratamento com a pele dos peixes AM e SH, foram vistas reduções de 49% e 44% respectivamente, quando comparados ao controle estimulado com OVA e não tratado, no entanto, não foram significativas ($p > 0,05$). A

dexametasona, entretanto, foi capaz de reduzir em 72% a população expressando os marcadores CD3/ CD25.

Figura 18 - Efeito do tratamento com a pele dos peixes sobre as populações de linfócitos T CD3⁺ e linfócitos T ativados CD3⁺/ CD25⁺ em linfonodos 72 h após edema de pata induzido por ovalbumina



Fonte: (Do autor, 2017).

A avaliação de linfócitos foi feita a partir da coleta e dissociação dos linfonodos poplíteos de cinco animais (selecionados ao acaso) utilizados no ensaio de edema de pata com OVA. Após estímulo na pata direita com 50 µg de OVA, os animais aguardaram por mais 72 h para coleta do linfonodo poplíteo direito (linfonodo drenante). Os linfonodos foram pesados e dissociados mecanicamente em placa de petri homogeneizados em 500 µL de tampão PBS. Os homogenatos foram ajustados para a ordem de 10⁵ células/ mL, pH 7,2 e destes, uma alíquota de 50 µL de cada foi marcada com os anticorpos monoclonais anti CD3 conjugado ao fluoróforo PerCP-Cy™ 5.5 e o anticorpo monoclonal anti CD25 conjugado ao fluoróforo FITC. As amostras ressuspensas em 500 µL de PBS azida 0,1% foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), n ≥ 5/grupo. O sinal (*) indica a significância estatística entre os grupos: estimulados e tratados (Dexa e pulverizados) e estimulado (OVA), sem tratamento, (p ≤ 0,05). O marcador (#) indica significância estatística entre os grupos desafiados com ovalbumina e controle salina (p ≤ 0,05).

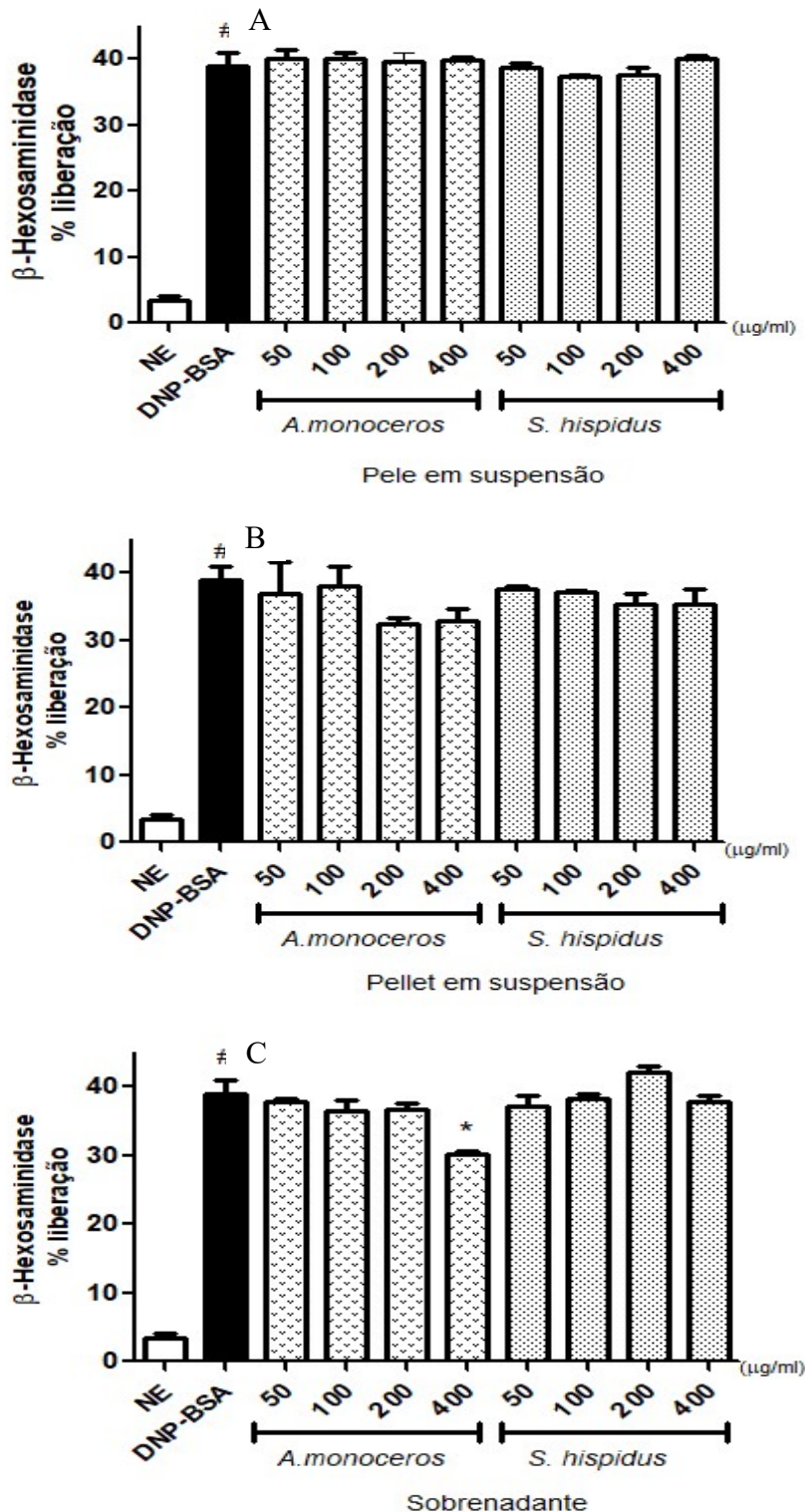
4.4 Ensaios *in vitro* com o pulverizado da pele dos peixes e seus produtos de hidrólise

4.4.1 Avaliação dos efeitos da pele e dos produtos de hidrólise sobre a liberação de β-hexosaminidase (β-Hex) em linhagem basofílica RBL-2H3

Uma vez observado que a administração dos pulverizados das peles dos peixes foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata induzido por histamina. Com o objetivo estudar se há nestas peles a capacidade inibitória da degranulação de mastócitos, utilizamos os pulverizados e os seus produtos de hidrólise com papaína em linhagem basofílica RBL-2H3 sensibilizada com IgE anti-DNP, para a quantificação da enzima β-hexosaminidase. Assim sendo, as células foram pré-tratadas com diferentes concentrações das peles e produtos de

suas hidrolises e estimuladas com DNP-BSA. Na figura 19C é apresentada a redução significativa de 22,5% ($p \leq 0,05$) da liberação de β -Hex pela linhagem RBL-2H3 na presença de 400 $\mu\text{g/ mL}$ do sobrenadante da pele do peixe AM. Não foram observadas reduções significativas para as demais concentrações do sobrenadante, bem como para o pellet (figura 19B) e o pulverizado da pele do peixe AM (figura 19A). Para o pulverizado da pele do peixe SH (figura 19A) e os produtos de sua hidrólise (pellet e sobrenadante) (respectivamente, figuras 19B e 19C), a redução da liberação de β -Hex não foi observada.

Figura 19 - Efeito do pré-tratamento (1h antes) com diferentes concentrações do pó das peles e dos produtos da hidrólise de *A. monoceros* e *S. hispidus* sobre a degranulação da linhagem basofílica RBL-2H3 induzida por DNP-BSA por 24h à 37° C, 5% CO₂.



Fonte: (Do autor, 2018).

As células da Linhagem RBL-2H3 (10^5 células/ poço) foram tratadas por 1 hora com o pulverizado da pele (A), pellet papaína (B) ou sobrenadante papaína (C) e então estimulados com DNP-BSA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com base em 3 ensaios (em triplicata). O símbolo (#) indica diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos estimulado e não estimulado. O símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos tratado e não tratado.

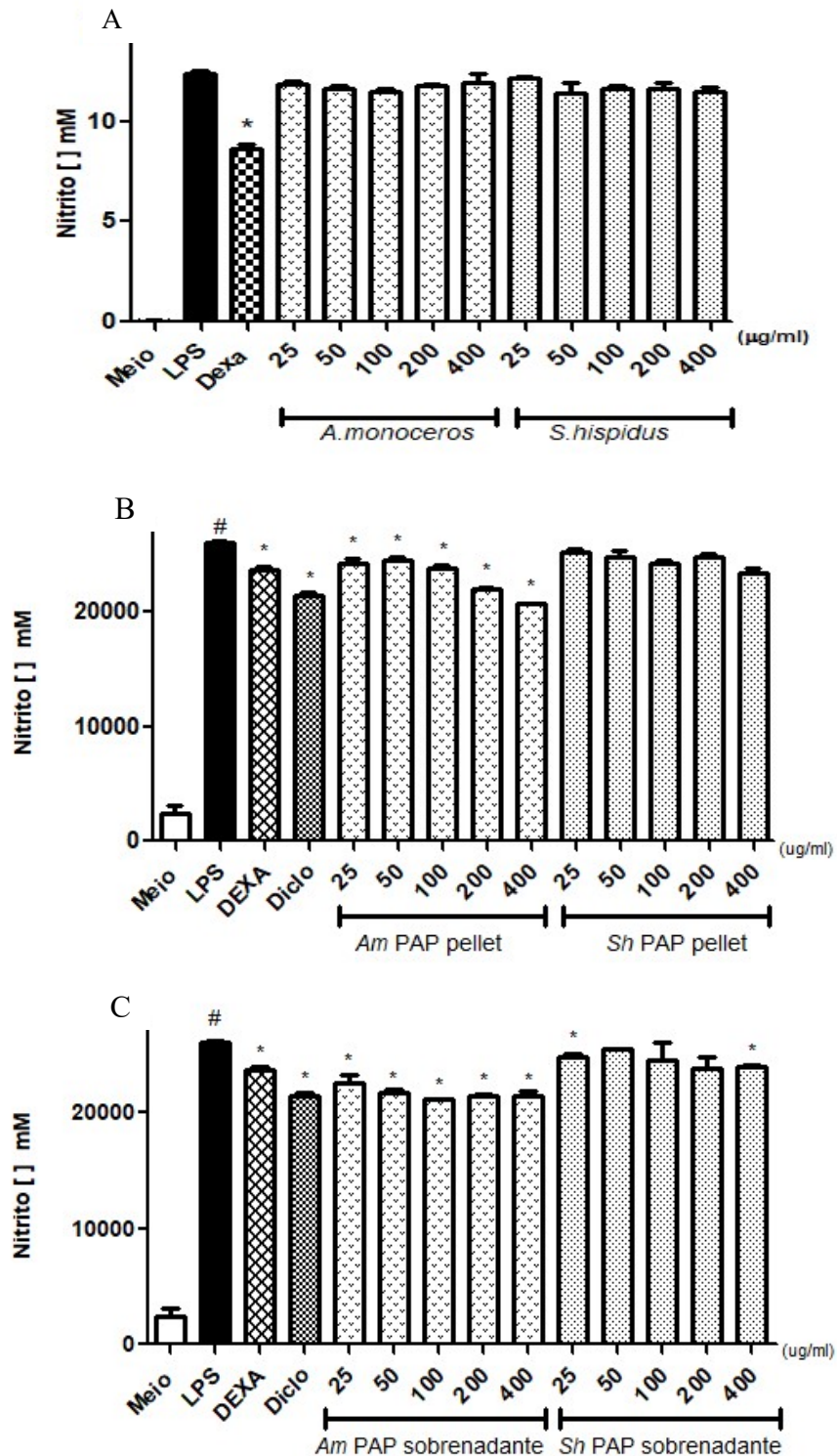
4.4.2 Avaliação dos efeitos da pele e dos produtos de hidrólise sobre a produção de NO em macrófagos murinos J774-A1

Avaliamos o efeito do pré-tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH, bem como os produtos das suas hidrólises (pellets e sobrenadantes) sobre os teores de NO produzidos nos sobrenadantes da cultura de macrófagos murinos J774-A1, estimuladas com LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Na figura 20A podemos ver que não houve alteração da produção de NO face à exposição da linhagem aos pulverizados das peles dos peixes AM e SH, em contrapartida, na figura 20B é verificada a redução da produção de NO nas células pré-tratadas com a pele do peixe AM, houve depleção significativa da concentração de nitrito em todas as concentrações do pellet de AM, chegando a 10% com o tratamento na concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No entanto, curiosamente, o tratamento com os pellets da pele do peixe SH não mostrou redução significativa da produção de NO

Com o tratamento prévio nas diferentes concentrações do sobrenadante (figura 20C), foi possível verificar inibição da produção de NO. O sobrenadante da pele do peixe AM reduziu a quantificação de nitrito em todas as concentrações chegando a 19% de redução, na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Já o sobrenadante da produzido da hidrólise da pele do peixe SH foi capaz de conter a acumulação de NO em suas concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obtendo de 8% da redução do teor de NO em sua maior concentração.

Figura 20 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações da suspensão da pele e dos produtos da hidrólise da pele dos peixes na produção de óxido nítrico em macrófagos murinos da linhagem J774A.1.



Fonte: (Do autor, 2018).

Linhagem J774A.1 (10^5 células/ poço) foram tratadas por 1 hora com pele (A), pellet papaína (B) ou sobrenadante papaína (C) e então estimulados com LPS (1 µg/ ml) e incubados por 24h à 37°C 5%CO₂. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com base em 3 ensaios (em triplicata). O símbolo (#) indica diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos estimulado e não estimulado. O

símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos tratado e não tratado.

4.4.3 Ensaio de citotoxicidade com as peles dos peixes AM e SH e os seus produtos de hidrólise com papaína

As células de ambas as linhagens RBL-2H3 e J774-A1 foram avaliadas para a citotoxicidade na presença dos pulverizados das peles e dos produtos resultantes da hidrólise com papaína. A viabilidade celular foi verificada após a exposição às concentrações de 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dos pulverizados das peles dos peixes e produtos da hidrólise com papaína pelo período de 24h, utilizando o método da resazurina, os resultados estão apresentados no quadro 2.

Não foi verificada a citotoxicidade de nenhum dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH *in natura*.

Quanto ao tratamento com o pellet da pele do peixe AM, houve perda de viabilidade celular em torno de 39% na concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para na linhagem basofílica RBL-2H3, no entanto, não houve perda de viabilidade celular para as células da linhagem de macrófagos J774-A1.

Referente ao tratamento com o pellet da pele SH, na linhagem basofílica, houve redução da viabilidade celular em torno de 41% nas maiores concentrações (400 e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Já para a linhagem de macrófagos J774-A1 houve perda de cerca de 20% da viabilidade celular em todos os tratamentos.

No pré-tratamento com os sobrenadantes derivados da hidrólise dos pulverizados da pele do peixe AM obtivemos redução da viabilidade celular da linhagem RBL-2H3 em torno de 39%. Para a linhagem J774-A1, apenas na concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ houve perda da viabilidade de aproximadamente 50%.

Já o sobrenadante da pele do peixe SH, mostrou reduzir progressivamente a viabilidade celular da linhagem RBL-2H3, nas maiores concentrações (400 e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) apresentou perda da viabilidade em torno de 45%. Na cultura de macrófagos murinos, foi verificada perda de 50% na dose de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 20% na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Quadro 2 - Efeito da suspensão pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem murina J774.A1.

Viabilidade celular (%) do pó das peles e produtos de hidrólises							
		<i>Aluterus monoceros</i>			<i>Stephanolepis hispidus</i>		
	[] ug/ml	Pele	Pellet	Sobrenadante	Pele	Pellet	Sobrenadante
J774 A1	400	98,73± 11,36	73,84± 1,05	47,97± 3,42*	100± 13,95	80,87± 1,29*	47,30± 5,11*
	200	100± 5,50	84,72± 2,73	89,01± 4,90	99,83± 6,69	82,03± 3,87*	80,41± 0,90*
	100	100± 12,44	89,03± 1,63	90,27± 6,84	93,08± 3,95	79,72± 2,33*	89,16± 9,91
	50	100± 9,17	100± 7,29	86,08± 4,04	99,36± 9,17	81,04± 3,99*	82,51± 0,83
RBL-2H3	400	82,51± 2,57	60,64± 1,19*	60,68± 2,03*	87,05± 0,83	58,83± 0,86*	55,26± 0,75*
	200	97,06± 1,12	78,63± 2,71	60,78± 0,17*	95,61± 2,08	58,5± 1,71*	53,08± 2,76*
	100	100± 3,64	85,56± 0,70	95,05± 0,54	88,29± 4,46	77,74± 5,59	69,28± 6,61*
	50	96,42±0,46	84,21± 0,95	89,05± 0,64	93,92± 2,24	77,65± 6,70	77,69± 4,65*

Fonte:(Do autor, 2018).

As células foram distribuídas em densidade de $2,5 \times 10^5$ células/ poço e tratadas com diferentes concentrações das peles e produtos de hidrólise. A viabilidade foi determinada pelo método da resazurina (Alamarblue®). A avaliação foi realizada com base na média das absorbâncias obtidas \pm o erro padrão em cada concentração, comparadas ao controle (não tratado) representando 100% de viabilidade celular. O símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de ($p < 0,05$).

4.5 Avaliação de toxicidade oral aguda

4.5.1 Avaliação dos sinais clínicos

Com o intuito de confirmar a segurança do consumo destes pulverizados, a etapa seguinte consistiu em avaliar os animais 14 dias após administração (v.o) de 2g dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH, conforme protocolo de toxicidade oral aguda OECD 420. Referente aos sinais clínicos, os tratamentos com os pulverizados não mostraram alterações do comportamento dos animais e não houve alterações na resposta frente aos estímulos utilizados. Não houve anotação ou referência a condição de enfermidade dentre os animais de cada grupo durante o período de avaliação. Em nenhum momento houve necessidade de finalização humanitária, conforme o expresso no quadro 3.

Quadro 3 - Sinais clínicos em camundongos Balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus*.

SINAIS CLÍNICOS													
Fêmeas n=5	Exploração	Frêmito vocal	Resposta ao toque	Pinçamento caudal	Ataxia	Reflexo de endireitamento	Reflexo auricular	Reflexo Palpebral	Piloereção	Dacriorréia	Ptoses	Micção	Defecação
CTRL	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
<i>A. mono</i> (2g)	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
<i>S. hisp</i> (2g)	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
* sem óbitos durante todo o período de avaliação para todos os grupos													

Fonte:(Do autor, 2017).

4.5.2 Avaliação de ganho de peso

Para informações referentes a efeitos da pele dos peixes sobre o progresso do peso dos animais, com base nos dados de pesagens realizadas nos dias 01, 03, 07 e 14.

O somatório expresso em média e erro padrão da média de cada grupo experimental mostrou uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) do progresso do peso dos animais que receberam a pele do peixe SH, quando comparado aos outros grupos, apresentado em quadro 4. No entanto, como pode ser observado na figura 21, durante avaliação não houve decaimento do peso médio de cada grupo durante o período de avaliação, houve, por outro lado, o progresso de peso mais demorado para o grupo que recebeu a pele do peixe SH frente ao grupo controle.

Quadro 4 - Ganho de peso 14 dias após administração de 2000 mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus*.

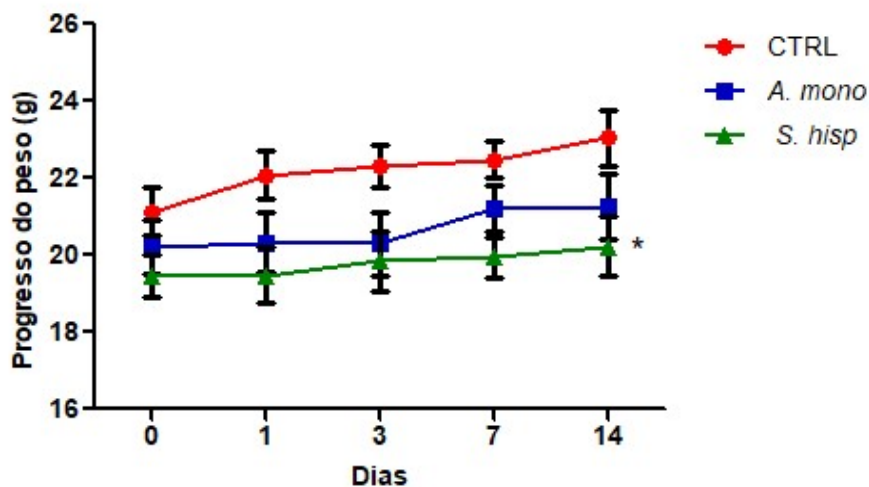
Ganho de Peso - Toxicidade oral aguda			
n=5	Ctrl	<i>A. mono</i> (2g)	<i>S. hisp</i> (2g)
Fêmeas	9,63± 0,280	5,22± 0,170	3,75± 0,281*

Dados expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5 por grupo).
*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).

Fonte: (Do autor, 2017).

Os dados de ganho de peso foram obtidos pela soma ± erro padrão das diferenças (Δ) entre os pesos dos animais de cada grupo nos dias de pesagem (0,1,3,7 e 14), o cálculo consistiu no somatório das diferenças entre as pesagens realizadas: Ganho de peso final (g) = Σ (Peso D₁ - P_{inicial}) + (Peso D₃ - Peso D₁) + (Peso D₇ - Peso D₃) + (Peso D₁₄ - Peso D₇). Os dados foram obtidos após a administração em dose única com 2000 mg/kg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* em suspensão salina (v.o.). O símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de (p ≤ 0,05).

Figura 21 - Progresso do peso dos animais durante 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus*



Fonte: (Do autor, 2017).

Progresso de peso foi obtida pela média ± erro padrão do peso dos animais de cada grupo nos dias de pesagem (0,1,3,7 e 14), após a administração em dose única com 2000 mg/kg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* em suspensão salina por gavagem (v.o.). Cada ponto representa a média ± EPM (erro padrão da média) de cada grupo. O símbolo (*) indica a significância estatística de (p ≤ 0,05).

4.5.3 Avaliação de ingestão alimentar

Os dados da ingestão alimentar foram expressos em média e erro padrão da média, conforme o apresentados no quadro 5. Os dados não mostraram alterações significativas entre os grupos tratados e o grupo controle, todos ingeriram em proporções equivalentes o alimento ofertado conforme os padrões fisiológicos da espécie avaliada.

Quadro 5 - Ingestão alimentar total (g) por indivíduo, em camundongos Balb c, durante 14 dias.

Ingestão alimentar - Fêmeas (n=5)			
	CTRL	<i>A. mono</i>	<i>S. hisp</i>
Consumo ração (g)	19,63±0,136	17,84±0,172	19,28±0,230
Os dados foram expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5/grupo). *Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).			

Fonte: (Do autor, 2017).

Os valores foram obtidos a partir do somatório das pesagens individuais da ração consumida por cada animal no período: Soma da Ingestão Alimentar (g) = \sum Consumo D1 + Consumo D3 + Consumo D7 + Consumo D 14. Os dados foram obtidos pela soma \pm erro padrão da média do consumo de ração de cada grupo nos dias 0,1,3,7 e 14, após a administração em dose única com 2000 mg/kg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* em suspensão salina (v.o.).

4.5.4 Avaliação peso absoluto e relativo de órgãos

Após avaliação macroscópica, os órgãos foram retirados e dissecados para fins de pesagem e registro do peso absoluto. Para o peso relativo realizamos a proporção do peso do órgão pelo peso corporal para obtenção do dado a ser avaliado.

A reunião dos dados está apresentada no quadro 6, constando a média \pm o erro padrão do peso dos órgãos, com estes foi possível a constatação da diminuição significativa ($p \leq 0,05$) entre os pesos absolutos do fígado do animal tratado com 2 mg/ kg da pele do peixe SH ($0,963 \pm 0,071$, n=5) frente ao grupo controle ($1,165 \pm 0,063$, n=5). Sendo esta diferença a única constatada entre os órgãos frente à exposição ao tratamento com a pele dos peixes AM e SH.

Quadro 6 - Peso absoluto (g) e relativo ((g)/ (g)PC) dos órgãos de camundongos balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus*

Peso Absoluto e Peso relativo dos órgãos			
(g) (g)/(g)PC	CTRL	<i>A. mono</i> (2g)	<i>S. hisp</i> (2g)
Baço	0,1025±0,0068	0,0842±0,0054	0,0903±0,0057
	0,4429±0,0185	0,3976±0,0257	0,4496±0,0349
Fígado	1,1651±0,0633	0,9235±0,0565	0,9262±0,0705*
	5,0442±0,1441	4,3637±0,2864	4,597±0,3506
Rins (Esq.+Dir.)	0,2813±0,0012	0,2704±0,0105	0,2593±0,0213
	1,2192±0,0233	1,2979±0,0665	1,2872±0,1077
Os dados foram expressos em Média ± Erro padrão da média (n=5/grupo).			
*Diferença estatística significativa do grupo controle (p > 0,05).			

Fonte: (Do autor, 2017).

O peso absoluto foi apresentado pela média ± erro padrão da pesagem direta dos órgãos em cada grupo. O peso relativo foi obtido pela média ± erro padrão dos pesos dos órgãos dividido pelo peso corporal de cada indivíduo de cada grupo. O símbolo (*) indica a significância estatística ao nível de (p< 0,05).

4.5.5 Avaliação hematológica

Referente aos dados hematológicos dos camundongos observados, não houve variação estatisticamente significativa dos parâmetros comparados, assim sendo, não houve evidências de sinais tóxicos decorrentes do tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH administrados, conforme pode ser observado no quadro 7.

Quadro 7 - Dados hematológicos dos camundongos Balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus*.

DADOS HEMATOLÓGICOS - Fêmeas - n= 5/ grupo			
Parâmetros	CTRL	<i>A.mono</i> (2g)	<i>S. hisp</i> (2g)
Hematócrito (%)	51,05±1,26	49,71±1,23	50,22±1,34
Hemácias (he x 10 ⁶ / mm ³)	8,67±0,62	8,98±0,16	9,09± 0,60
Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	2,43± 0,42	1,91± 0,32	2,08± 0,44
Mononucleares (x10 ³ /mm ³)	1,60± 0,24	1,42± 0,24	1,49± 0,34
Neutrófilos (x10 ³ /mm ³)	0,81± 0,19	0,45± 0,01	0,56± 0,13
Eosinófilos (x10 ³ /mm ³)	0,03± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03± 0,02

Fonte: (Do autor, 2017).

4.5.6 Avaliação bioquímica

Os parâmetros bioquímicos verificados mostraram diferença estatística nos teores de colesterol no soro dos animais entre os grupos tratados com ambos os pulverizados e o grupo CTRL. Os grupos que receberam tratamento apresentaram teores de colesterol em torno de 20% menores, entretanto, todos os animais se apresentaram dentro da faixa de referência informada pelo laboratório onde os testes foram realizados.

Na comparação estatística entre os teores séricos de fosfatase alcalina foi evidenciada diferença significativa, os valores encontrados no grupo dos animais que receberam a pele do peixe SH encontravam-se 17,4% abaixo dos valores encontrados no grupo controle, no entanto, todos os animais encontravam-se na faixa de referência informada pelo laboratório responsável. Os demais parâmetros não mostraram variação estatística significativa, estando os animais tratados e o controle na faixa da normalidade informada pelo referido laboratório, conforme o apresentado no quadro 8.

Quadro 8 - Dados bioquímicos dos camundongos Balb c fêmeas, 14 dias após administração de 2000 mg do pulverizado da pele dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus*

DADOS BIOQUÍMICOS - Fêmeas - n= 5/ grupo				
Parâmetros	Valores de referência (range)	CTRL	<i>A. mono</i> (2g)	<i>S. hisp</i> (2g)
Colesterol (U/ L)	36,00- 96,00	58,00± 5,3	45,00± 0,00*	46,8± 1,8*
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,20- 080	0,16± 0,02	0,16± 0,02	0,1± 0,00
Aspartato Aminotransferase (AST) (U/ L)	59,00- 247,00	58,80± 8,07	59,20± 5,38	53,00± 5,62
Alanina Aminotransferase (ALT) (U/ L)	28,00- 132,00	21,40± 1,44	24,80± 1,93	22,20± 2,33
Fosfatase alcalina (U/ L)	62,00 209,00	148,40± 6,31	136,60± 6,66	122,60± 6,56*

Fonte: (Do autor, 2017).

4.6 Avaliação preliminar do perfil químico da pele dos peixes AM e SH

4.6.1 Quantificação de proteínas totais

A determinação da quantidade de proteínas do pulverizado da pele dos peixes AM e SH se deu pela mudança colorimétrica do Reagente de Bradford. Os valores obtidos encontram-se sintetizados na quadro9. Na quantificação dos pulverizados das peles dos peixes foi observado de 0,283 µg e 7,646 µg de proteínas/ mg pó para as espécies AM e SH, respectivamente. Em relação ao material liofilizado, proveniente da hidrólise proteolítica, foi observado 30,44 µg de proteínas/ mg para o pellet da espécie AM e 28,53 µg de proteínas/ mg para o SH; e para o sobrenadante, 30,23 µg de proteínas/ mg e 29,39 µg de proteínas/ mg, respectivamente.

Quadro 9 - Quantificação de proteínas dos pulverizados das peles dos peixes *A. monoceros* e *S. hispidus* e dos respectivos produtos de hidrólise com papaína

Quantidade de proteínas totais $\mu\text{g}/\text{mg}$ - método de Bradford		
	<i>A. monoceros</i>	<i>S. hispidus</i>
Pele	0,28 \pm 0,001	7,65 \pm 0,001
Pellet	30,44 \pm 0,002	28,53 \pm 0,003
Sobrenadante	30,23 \pm 0,010	29,39 \pm 0,015

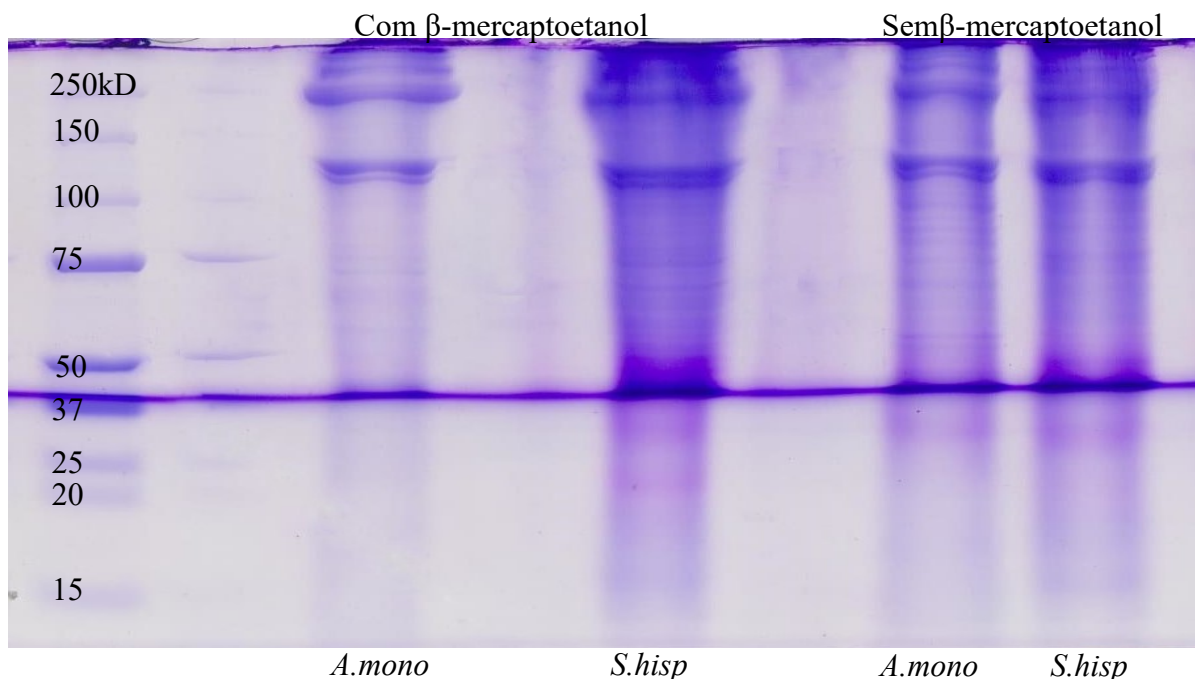
Fonte: (Do autor, 2017).

4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)

No estudo do perfil protéico, foi realizada uma SDS-PAGE, utilizando um sistema Mini-protean II (Bio-Rad). As análises do pulverizado da pele e do seu hidrolisado permitiram a visualização de diferentes bandas e regiões de arraste como é possível observar nas figuras 22 e 23.

Foi evidenciado, a partir da comparação com o padrão de peso molecular, à esquerda do gel, grande similaridade do perfil proteico entre as duas espécies, conforme o apresentado no quadro 9. A adição do agente redutor β -mercaptoetanol, que cliva pontes dissulfeto, não alterou significativamente o perfil das amostras (Figura 22).

Figura 22 - Separação das proteínas utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%), corado com azul de comassie.

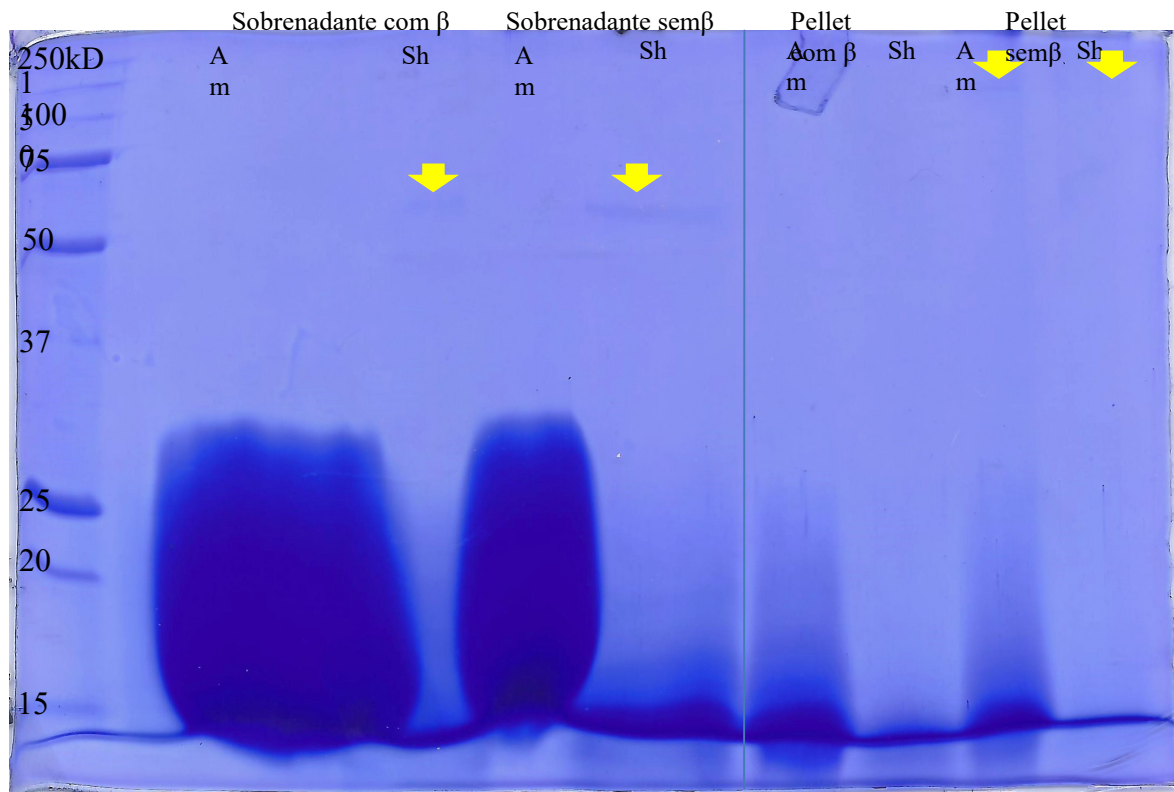


Fonte: (Do autor, 2017).

Avaliação do perfil protéico unidimensional das peles de ambos os peixes porco nas condições com ou sem agente redutor (desnaturante) β -mercaptoetanol

A análise do material hidrolisado permitiu verificar a eficiência da metodologia de hidrólise aplicada. Para o sobrenadante de SH, uma banda de aproximadamente 60 kD é vista na condição de não redução e redução e não é observada para o AM.

Figura 23 - Separação das proteínas dos produtos da hidrólise com Papaína (20U/g) utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE - 15%), corado com azul de comassie



Fonte: (Do autor, 2017).

Avaliação do perfil protéico unidimensional dos produtos da hidrólise com papaína das peles de ambos os peixes porco nas condições com ou sem agente redutor (desnaturante) β-mercaptoetanol.

5 DISCUSSÃO

O intuito deste trabalho foi verificar a atividade biológica e a segurança de um hábito estabelecido entre populações caiçaras, que ingerem a pele de peixes-porco (*Aluterus monoceros* e *Stephanolepis hispidus*) para fins de amenização dos sintomas de asma (PAZ; BEGOSSI, 1996b; EL-DEIR *et al.*, 2012; RAMIRES *et al.*, 2012; PINTO; MOURÃO; ALVES, 2015). Foi avaliada inicialmente a ação farmacológica do pulverizado da pele dos peixes-porco por meio de modelos experimentais em camundongos, com a finalidade de confirmar a atividade declarada pelas populações que realizam a prática, evidenciando ação anti-inflamatória e anti-histamínica destes pulverizados. Na tentativa de obter as primeiras informações referentes à composição deste produto natural foi feita a hidrólise destes pulverizados, simulando o processo digestivo e os produtos obtidos deste processo foram aplicados em duas populações celulares distintas para fins de compreensão de alguns de seus mecanismos de ação. Destas avaliações, foi verificado um potencial redutor da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos murinos, conseqüentemente mostrando poder de atuação sobre permeabilidade vascular. Em seguida, foi feita a avaliação de toxicidade oral aguda, através do protocolo de doses fixas, OECD 420, para fins de fornecer as primeiras informações referentes à segurança desta utilização e os resultados apresentados não mostram indícios de toxicidade.

A utilização da pele seca a temperatura ambiente e triturada teve como objetivo simular a prática caiçara convencional, sem modificar a constituição da pele dos peixes, como em alguns estudos que investigaram suas atividades biológicas (CAVALLI *et al.*, 2003; MUCCILLO-BAISCH; BRUM; ANDRADE, 2007b; CARVALHO *et al.*, 2013).

Com a finalidade de estabelecer a melhor dose para os ensaios *in vivo*, utilizamos o modelo de pleurisia alérgica com a linhagem BALB/c previamente sensibilizada com OVA.

Este é um modelo bem estabelecido que permite uma forte resposta de padrão T_H2 , implicando em recrutamento e ativação de eosinófilos, sendo um modelo mais curto de experimentação, que permite acumulação destes mediadores na cavidade pleural e de mais fácil acesso, visto que o lavado pleural é um procedimento de fácil execução frente ao lavado broncoalveolar (LIMA *et al.*, 1997; FERRARIS *et al.*, 2012). Em um primeiro momento, conforme o apresentado nas figuras 11 e 12 foi possível verificar a atividade biológica decorrente da administração da pele dos peixes, com a dose de 500 mg/kg, pois observou-se

redução do infiltrado leucocitário total na cavidade pleural apresentando percentuais equivalentes, de 40% ao passo que o controle farmacológico obteve 55%. O infiltrado neutrofílico também se mostrou reduzido na faixa de 40% para ambos os pulverizados. A respeito da inibição do infiltrado eosinofílico, com a administração de 500 mg/ kg do pulverizado da pele SH, a redução observada (53%) foi próxima à redução observada com o controle dexametasona (56%), já o material da pele do peixe AM promoveu inibição de 48% deste infiltrado. Foram verificadas, da mesma forma, inibições dos demais grupos celulares envolvidos na resposta alérgica, o acúmulo neutrofílico e o infiltrado de mononucleares. Por outro lado, na avaliação da dose de 750 mg/ kg, tendo em vista que o tratamento foi uma suspensão de pulverizado insolúvel, houve limitação da administração, pois o maior teor de partículas da pele dos peixes provocou o entupimento da cânula esofágica dificultando o procedimento e ocasionando maior variação da resposta à dose. A menor dose com melhor efeito, foi a de 500 mg/ kg por essa razão, foi selecionada para a continuidade das etapas de avaliação de atividade anti alérgica destes pulverizados.

Os lavados dos animais dos ensaios de pleurisia que receberam a dose de 500 mg/ kg foram utilizados para a avaliação da formação de exsudado protéico, da secreção de IL-5 e quimiocinas eotaxina-1 e RANTES produzidas pelos animais pré-tratados com os pulverizados. No intuito de verificar se o tratamento com os pulverizados poderiam interferir com a produção deste mediador, e conseqüente recrutamento de eosinófilos, foi realizada a dosagem da IL-5 presente nos lavados pleurais. Nossos achados mostram que não houve redução da produção de IL-5 conforme o apresentado na figura 11B, apesar da redução eosinofílica encontrada nos lavados pleurais e broncoalveolares. A IL-5 é uma interleucina que tem um papel fundamental na ativação da diferenciação de eosinófilos na medula óssea, no seu recrutamento e ativação. O uso de terapia anti IL-5 é recomendada para eosinofilia severa em pacientes asmáticos de forma a reduzir a exacerbação dos sintomas. No entanto, pacientes que recebem terapia anti IL-5 podem ainda apresentar níveis elevados de eosinófilos indicando que outras terapias suplementares são necessárias e mostrando outras vias de ativação e recrutamento deste grupo celular (ESNAULT; KELLY, 2016; VARRICCHI *et al.*, 2016). Por outro lado, pacientes sob tratamento com glicocorticóides inalatórios podem persistir com níveis mais altos de IL-5, os autores deste trabalho atribuem esta persistência da produção de IL-5 a células mononucleares presentes no sangue periférico (JOSEPH *et al.*, 2004).

Quando circulantes, os eosinófilos interagem com o endotélio por meio de processos envolvendo rolamento, moléculas de adesão e diapedese. O trânsito deste grupo celular para

os focos inflamatórios está envolvido com uma série de citocinas, em particular as citocinas T_H2 , moléculas de adesão como integrinas $\beta1$, $\beta2$, $\beta7$ e quimiocinas como RANTES e as eotaxinas. Avaliamos a presença dessas quimiocinas inflamatórias nos lavados pleurais, uma vez que houve redução do infiltrado eosinofílico, o intuito desta etapa foi verificar se esses fatores atraentes de eosinófilos estariam reduzidos conforme o verificado para o grupo celular (ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Vimos nas figuras 13C e 13D que os teores de eotaxina-1 e RANTES encontravam-se depletados nos lavados pleurais dos animais que receberam o tratamento com os pulverizados das peles dos peixes AM e SH, respectivamente, 21% e 28% para a eotaxina-1 e 34% e 45% para RANTES. Visto que houve a redução da presença de eosinófilos, é esperada a redução destas quimiocinas uma vez que estas estão envolvidas em seu próprio direcionamento, sendo produzidas por eosinófilos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Nesta etapa da avaliação, também foi observada a redução de 25% de proteínas totais no exsudado dos lavados pleurais de animais estimulados com OVA, que receberam do pulverizado da pele do peixe SH, embora não tenha sido significativa, a pele do peixe AM fornecida aos animais também apresentou diminuição da quantidade proteínas totais dos lavados pleurais, conforme o apresentado na figura 13A.

Aditivamente, dados da literatura mostram que o tratamento com peptídeos derivados de escamas de peixe tilápiapode produzir efeito anti-inflamatório em cultura de queratinócitos humanos (HaCaT) estimuladas com cloreto de cobalto ($CoCl_2$), um metal relacionado à dermatites alérgicas ou $TNF-\alpha$. A atividade imunomoduladora foi evidenciada pela inibição da produção de espécies reativas de oxigênio e transdução de sinais como o $NF-\kappa B$ (SUBHAN *et al.*, 2017). Com a inibição da transdução de sinais como o $NF-\kappa B$ sugere-se a possibilidade da redução da produção das quimiocinas no sítio inflamatório a partir da inibição de $NF-\kappa B$ em células envolvidas no processo inflamatório alérgico. Além disso, foi vista a redução da expressão de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e $TNF-\alpha$ em cultura de células endoteliais venosas humanas (HUVECs) tratadas com colágeno hidrolisado derivado de escamas de tilápia estimuladas com lipopolissacarídeo LPS (LIU; XUE; SUN, 2014).

Frente a estes achados seguimos com o modelo de inflamação pulmonar alérgica na intenção de mimetizar a asma em camundongos. Camundongos BALB/c com resposta pulmonar alérgica aguda tem sido o modelo mais adequado para investigação sobre a fisiopatologia da doença e avaliar a eficácia de novos fármacos como teste pré-clínico. Referente ao ensaio de inflamação pulmonar, preconizado como o protocolo de asma mais apropriado por apresentar influxo leucocitário nas vias aéreas com predomínio eosinofílico, assim reproduzindo aspectos da asma em humanos (GUALDI *et al.*, 2010; RODRIGUES *et*

al., 2012a). Com o emprego deste modelo experimental apresentado na figura 14, novamente os tratamentos com 500 mg/ kg da pele dos peixes AM e SH pulverizada (no dia anterior e 1 h antes dos desafios antigênicos realizados em três dias seguidos) foram suficientes para redução de 42% do infiltrado inflamatório, o equivalente ao tratamento com o fármaco de referência, que proporcionou 45% de limitação deste infiltrado. Referente ao acúmulo neutrófilico, os pulverizados foram capazes de inibir em 58% e 49%, respectivamente AM e SH; ao passo que a dexametasona produziu 71% de declínio da população de neutrófilos nos lavados broncoalveolares. Em adição, a dexametasona foi capaz de reduzir o infiltrado eosinofílico em 93%, trazendo a níveis basais a contagem de eosinófilos nos lavados, no entanto, a redução obtida com o pulverizado da pele de ambos os peixes chegou a 52%. Vale ressaltar que o tratamento com glicocorticóide como a dexametasona, inibe a transcrição de fatores, especialmente os fatores NF- κ B e AP-1, envolvidos na síntese da maioria das citocinas e quimiocinas implicadas no processo de asma, em geral, a inibição da transcrição destes fatores, acarreta um intenso declínio da ativação e do recrutamento de leucócitos, também interferindo na expressão de moléculas de adesão e impactando diretamente na sobrevivência de grupos celulares (VAN DER VELDEN, 1998).

De acordo com os achados mencionados anteriormente, a avaliação do sangue colhido da cauda dos animais utilizados no ensaio de inflamação pulmonar alérgica forneceu informação adicional; foi verificada a redução leucocitária total de 26% e 24% para os tratamentos com os pulverizados das peles AM e SH, respectivamente, comparada à 30% referente ao tratamento com a dexametasona (1 mg/ kg). Na contagem diferencial, entretanto, foi verificada a redução da população eosinofílica de 45% para o pulverizado AM e 48% para o SH, ao passo que a dexametasona foi capaz de inibir em 67% os eosinófilos no sangue periférico frente ao grupo estimulado não tratado. Uma hipótese que pode justificar a redução do recrutamento eosinofílico independente da IL-5, pode ser devido ao compartilhamento de vias de sinalização entre IL-5, IL-3 e o GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). A sinalização via IL-3 e GM-CSF, em conjunto com a sinalização da IL-5 são conhecidos mediadores envolvidos na diferenciação, sobrevivência, ativação e migração deste granulócito na inflamação alérgica (ROTHENBERG *et al.*, 1988; ESNAULT; KELLY, 2016). Além, do mais a IL-3 e o GM-CSF, produzidos por células T ativadas, são críticos para alguns grupos celulares responsáveis pela resposta imune à alérgenos, a IL-3 parece também estar implicada com diferenciação e sobrevivência de mastócitos e basófilos. O GM-CSF, por outro lado, parece estar envolvido com a sobrevivência dos eosinófilos, aparentemente como a citocina mais importante (PARK *et al.*, 1998). Assim sendo, estas duas

citocinas não avaliadas poderiam estar reduzidas e impactando na depleção de eosinófilos (LANTZ *et al.*, 1998; ESNAULT; KELLY, 2016). Vale ressaltar o RNA mensageiro da IL-5 tem sua expressão aumentada em células endoteliais da mucosa brônquica após exposição alérgica (HAMID *et al.*, 1991; VARRICCHI *et al.*, 2016).

Em um estudo sobre o efeito anti-inflamatório de tripeptídeo purificado, derivado do colágeno (CTP) em dermatite atópica, uma doença cutânea crônica caracterizada por eczema em resposta a alérgenos e mediada por IgE, foi avaliado se o CTP poderia produzir efeitos nos níveis das citocinas inflamatórias secretadas por queratinócitos humanos (NHEKs) estimulados com TNF- α , IFN- γ e IL-13, para produção de resposta inflamatória do tipo T_H2. Foi verificado que esta estimulação leva a expressão de RNA-mensageiros envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias (TARC/CCL17, MDC/CCL22 e TSLP), mas através do tratamento com CTP, os níveis foram reduzidos significativamente, no entanto, não houve supressão de citocinas como IL-1 α , IL-6, IL-8, indicando modulação específica da resposta T_H2. Neste mesmo estudo foi avaliada a capacidade migratória de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) frente aos tratamentos com CTP, uma vez que as citocinas TARC e MDC são indutoras de migração celular. Os dados mostraram que o CTP foi capaz de inibir a quimiotaxia, possivelmente por reduzir a produção de citocinas envolvidas nesta migração. Aparentemente os resultados deste estudo indicam que os peptídeos derivados do colágeno podem influenciar a via de transdução de sinais STAT-1 de produção de citocinas. Estes fatores de transcrição agem não só sobre a produção de citocinas inflamatórias, mas também quimiocinas e moléculas de adesão (CAMPOS, 2007; HAKUTA *et al.*, 2017).

Assim sendo, buscamos verificar outros mecanismos envolvidos no processo inflamatório da asma que indiquem como se dá esta atividade da pele dos peixes. Uma vez vista a redução do exudado buscamos avaliar *in vivo*, se ocorrerá a formação de edema frente aos pulverizados das peles dos peixes em camundongos.

Os mecanismos que envolvem o recrutamento eosinofílico dependem de inúmeras citocinas inflamatórias, que envolvem as células T_H2 (CAMPOS, 2005c; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Os mastócitos ativados pela IgE específica, novamente expostos ao alérgeno, liberam o conteúdo de seus grânulos contendo histamina permitindo o aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e elevação da secreção de muco; a adenosina, fator quimiotático de neutrófilos que contribui com a broncoconstrição e inibe agregação plaquetária; e ainda proteases neutras como a triptase que agem sobre os tecidos podendo gerar cininas, fatores quimiotáticos de leucócitos. Os sinais produzidos pela interação

alérgeno – mastócito ativado também levam aos sinais de ativação da fosfolipase A2 levando a produção de PGD₂, o mediador mais abundante gerado, ocasionando broncoespasmo intenso, os leucotrienos (LTC₄ e LTD₄) implicados como agentes vasoativos contribuem com a histamina para o aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa brônquica e as citocinas secretadas como o TNF, eotaxina-1 e RANTES que atuam no recrutamento de leucócitos principalmente o eosinófilo dando início à fase tardia (ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Todos estes eventos levam ao acúmulo leucocitário, primordialmente eosinofílico, e a formação de exsudado protéico no sítio da inflamação pelo acúmulo destes mediadores. Estes sinais, característicos da reação de hipersensibilidade do tipo I e observados na asma, foram verificados nos grupos experimentais que receberam indução com OVA tanto no modelo de pleurisia, quanto no de inflamação pulmonary (figuras 11, 12 e 14).

Somado aos dados anteriores, eventos ligados à retenção da permeabilidade vascular, poderiam justificar a redução de leucócitos no local da inflamação. Uma vez liberada a histamina, bradcinina, leucotrienos e outros mais mediadores pelos mastócitos ocorre a contração das células endoteliais produzindo lacunas intercelulares decorrente da ligação dos mediadores com os respectivos receptores, esta é uma resposta que leva em torno de 15 a 30 minutos e é denominada resposta transitória rápida. Outra resposta mais lenta e de ação prolongada ocorre em resposta a citocinas como o TNF, essa reação pode chegar a mais de 24 horas após o estímulo. Estes eventos permitem a saída de fluidos ricos em proteínas para o interstício, ocasionando a perda da pressão osmótica vascular e a drenagem de água e íons para os tecidos formando o edema, típico dos processos inflamatórios. A redução do infiltrado inflamatório observada no modelo de pleurisia alérgica, a diminuição do exsudado e do teor de quimiocinas em lavados pleurais e a retenção do acúmulo leucocitário em modelo de inflamação pulmonar alérgica aguda, para os tratamentos com ambos os pulverizados suscitou o nosso interesse de avaliar qual seria o impacto do tratamento com as peles dos peixes sobre processos de permeabilidade vascular. Ressalte-se que houve diferença do comportamento no tocante ao extravasamento protéico entre o tratamento com as duas peles, sendo a pele do peixe SH mais eficiente nesta contenção.

Para averiguar o efeito anti edematogênico dos pulverizados foi feito um pré-tratamento com 500 mg/ kg dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH, seguido de desafio com OVA 1 h após o tratamento em animais pré sensibilizados. As aferições realizadas neste ensaio foram ocorreram em quatro momentos, 30 minutos, 1 h, 2 h, e 3 h; na avaliação de 1 h após indução com OVA foi vista a redução do edema de 55% para a pele do

peixe AM e 69% para a pele do peixe SH, que mostrou atividade superior à dexametasona (10 mg/ kg), utilizada para o grupo controle (58%). Este evento mostra que com o pré-tratamento com a pele dos peixes é possível controlar o extravasamento intrínseco aos processos asmáticos.

Na tentativa de compreender os processos envolvidos nesta inibição, realizamos em sequência o ensaio de edema de pata, no entanto, neste momento o agente indutor foi a histamina. A histamina, pertence à classe das aminas vasoativas, é um potente e fugaz mediador, é secretada nos primeiros instantes após estimulação de um indivíduo alérgico, portanto, denominada resposta aguda ou imediata. No ensaio de edema de pata induzido por histamina, o tratamento se deu 1 h antes do estímulo e o fármaco de referência utilizado foi o cloridrato de prometazina, um anti histaminico H1, que bloqueia os receptores H diminuindo os efeitos da histamina em células do trato respiratório, principalmente sobre as vias de fosfolipase A, minimizando a produção de prostaglandinas e leucotrienos e sobre a ativação da transcrição nuclear NFκB, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias, assim dificultando a formação do edema (CRIADO *et al.*, 2010).

O observado nesta avaliação foi, portanto, um efeito anti histamínicodecorrente do tratamento com o pulverizado da pele dos peixes AM e SH, o edema dos animais foi controlado em 58% e 67% respectivamente, produzindo um efeito aproximado do fármaco de referencia (74.5%). Utilizamos os pulverizados e os hidrolisados das peles dos peixes em cultura de células da linhagem basofílica RBL-2H3, no intuito de verificar a existência de algum constituinte que pudesse inibir os processos de degranulação, anteriores à histamina, impedindo a ligação do antígeno à IgE ou impedindo a sensibilização de mastócitos via FcεRI. Esse grupo celular é considerado crítico, sendo o desencadeador do processo. Nestes eventos iniciais da inflamação alérgica, os mastócitos rapidamente se acumulam e degranulam, liberando o conteúdo de seus grânulos, iniciando o processo de hipersensibilidade imediata (HAN *et al.*, 2009). O tratamento com 400 µg/ mL do sobrenadante da pele do peixe AM produziu uma redução da degranulação de 22,5%, entretanto, em sua avaliação de citotoxicidade houve o decaimento da viabilidade celular indicando que a atividade visualizada podia ser devido à perda de viabilidade. A pele do peixe SH não produziu efeito sobre a degranulação da linhagem basofílica. Os compostos derivados dos glicosaminoglicanos também figuram entre os que possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória. O sulfato de dermatan é um glicosaminoglicano, análogo da heparina obtido do tecido conjuntivo de um Tunicato (*Styela plicata*) que apresenta efeitos anticoagulantes e que pode apresentar efeitos antiinflamatórios reduzindo a expressão de TNF-α, TGF-β e VEGF

(MAYER *et al.*, 2013) indicando efeito antiedematogênico de compostos também presentes na pele dos peixes.

Uma vez confirmada a permeabilidade vascular, pela presença de exsudado protéico e através do ensaio de edema de pata, verificamos qual seria a participação do óxido nítrico na frente ao tratamento com os pulverizados das peles dos peixes e dos produtos da hidrólise em diferentes concentrações. Com a indução por LPS a iNOS epitelial bronquial responde em defesa imunológica para fins de atrair macrófagos. Então o NO produzido pode interferir com a sinalização induzindo eventos pró-inflamatórios que levam ao aumento da permeabilidade vascular (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Em nossos resultados, com a pele do peixe AM foi verificada a redução da produção de NO em aproximadamente 20% na concentração de 100 µg/ mL sobrenadante e esta foi a melhor redução apresentada sem perda de viabilidade celular. Alguns estudos utilizando o colágeno da pele de peixes mostraram ação de peptídeos presentes nestes materiais. Em um dado da literatura recente, que avalia a ação antioxidante de hidrolisados da pele do peixe AM, os autores demonstram atividade imunomodulatória por meio de pré-tratamentos com os derivados da extração enzimática da pele do peixe porco em cultura de células RAW264.7 na densidade de $1,0 \times 10^5$ células/ mL, avaliando em seguida a produção de NO a partir da estimulação com LPS, foi verificado que diferentes concentrações do hidrolizado foram capazes de reduzir a geração de NO (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2016).

Com a finalidade de adicionar informações que pudessem ajudar a compreender os mecanismos de ação dos pós destas peles foi avaliado o efeito do tratamento sobre o processo de ativação de células T, uma vez que este grupo celular tem grande participação na permanência do processo inflamatório por meio da indução da secreção de citocinas do tipo T_H2 (LARCHÉ; ROBINSON; KAY, 2003; CAMPOS, 2005). Estudamos a população de células T e a população que apresenta o fenótipo de ativação (que expressam o ligante IL-2 (CD25). A partir de homogenatos de linfonodos poplíteos dos camundongos utilizados no ensaio de edema de pata com ovalbumina (linfonodos drenantes mais próximos do local da indução com ovalbumina). Em nossos achados, os grupos tratados com a pele dos peixes expressaram redução tanto da população de células T quanto para células T que expressam o marcador CD25, porém esta redução não foi significativa, indicando que o observado na figura 18 possa ser um evento secundário, reforçando a hipótese do controle da permeabilidade vascular.

Reunindo todos estes achados, é interessante constatar que houve sutil diferença entre as ações terapêuticas das peles dos peixes *in vivo*. O pulverizado da pele do peixe SH mostrou

atividade discretamente maior que o do peixe AM, curiosamente, a ação terapêutica é mais direcionada ao peixe SH pelos praticantes deste uso popular. Vale ressaltar que os couros apresentam densidades diferenciadas entre si, sendo o couro do peixe SH mais rígido, possivelmente por se tratarem de peixes de gênero e espécie diferentes, no entanto, compartilhando a homologia da mesma família (*Monacanthidae*).

A exemplo do apresentado por De Souza (2006) e colaboradores, a arquitetura histológica da derme de teleósteos é formada pela sobreposição e entrelaçamento de fibras colágenas (DE SOUZA *et al.*, 2006). O colágeno, em sua estrutura molecular simples, é insolúvel em água em virtude da concentração de aminoácidos hidrofóbicos, tanto no interior da molécula quanto em sua superfície (DA SILVA; PENNA, 2012), quando hidrolizado, aumenta sua solubilidade e a liberação peptídeos com atividade biológica (HUO; ZHAO, 2009). Como resultado, a característica mais importante do hidrolizado obtido é a composição com altos níveis de glicina e prolina, aminoácidos essenciais para estabilidade e regeneração de cartilagens (DA SILVA; PENNA, 2012).

Por se tratar de proteínas fibrosas com função estrutural, relacionadas à resistência mecânica, a alta incidência destas fibras no pulverizado justifica baixa solubilidade do pó de peixe em solução aquosa (quadro 9). Para fins de estudar o conteúdo proteico deste material, ele foi submetido à eletroforese (SDS-PAGE - figura 22) no qual foi possível observar a presença de diversas bandas que indicam uma composição de diferentes proteínas, o que pode ser justificado pelo fato da pele apresentar fibras colágenas imbricadas e proteínas não colágenas em sua composição (DE SOUZA *et al.*, 2006). O perfil de bandas apresentadas no gel sugerem similaridade com o perfil apresentado pelo colágeno do tipo I, pela presença de bandas majoritárias nas regiões superiores do gel, nas faixas de 250 a 150 kD e 150 a 100 kD (AHMAD; BENJAKUL, 2010, 2011; AHMAD *et al.*, 2011; KAEWRUANG; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013).

O método de hidrólise é o princípio básico para a realização da quebra de grandes cadeias proteicas e a obtenção destes hidrolisados pode ocorrer de três formas distintas, por meio da hidrólise ácida, hidrólise alcalina e hidrólise enzimática, entretanto a catálise enzimática possui benefícios, ou seja, é mais promissora quando se deseja produtos com alta funcionalidade e teor nutritivo. Este processo é despolimerizante, visa a recuperar proteínas solúveis, favorecendo sua absorção pelas células. Estas proteases participam tanto de processos degradativos como em vias biossintéticas, na liberação de peptídeos com ação farmacológica a partir das proteínas precursoras e na facilitação de transporte transmembrana por meio de modificações específicas e seletivas das proteínas. Assim sendo, é possível com o

uso destas enzimas o controle do grau de clivagem do substrato e a utilização de proporções adequadas enzima/ substrato e tempo de reação fornecem hidrolisados com diferentes estruturas moleculares, com propriedades funcionais que podem ser aplicadas em várias formulações. As proteases são as enzimas utilizadas em processos de digestão enzimática como a bromelina, a colagenase, a papaína, a pepsina, a neutrase, a tripsina, dentre outras. A papaína, entretanto é uma cisteíno protease, derivada do látex do mamão (*Carica papaya L.*), que possui ação bactericida, bacteriostática e anti-inflamatória e tem sua indicação no tratamento de escaras, úlceras abertas e como desbridante em tecidos de necrose (BRASIL, 2002; AMRI; MAMBOYA, 2012; NOMAN *et al.*, 2018). Vale ressaltar a aplicação da papaína bruta para a obtenção dos GAGs de peles de peixes como a guaiúba (*Ocyurus chrysurus*) e palombeta (*Choloroscombrus chrysurus*) previamente desidratadas ao sol (RODRIGUES *et al.*, 2011, 2012).

O propósito com a hidrólise do material foi mimetizar as condições que acontecem com a pele de peixe quando ingerida pelo indivíduo, ou seja, ela é digerida pelas proteases do sistema digestório em diversos peptídeos que possivelmente são os responsáveis pelo efeito biológico reportado. No material hidrolisado, foi possível observar no quadro 9 que o teor de proteínas aumentou para ambas as peles, sugerindo que a etapa de hidrólise foi capaz de promover a quebra de proteínas possivelmente constituintes das fibras colágenas. O liofilizado do sobrenadante originou um pó branco, com aspecto de cristal fino e leve, completamente solúvel em água. Após solubilização, a solução se tornava coloidal e transparente. Já em relação ao pellet liofilizado, o aspecto permaneceu semelhante ao material original (pulverizado da pele), com uma coloração escura e com alto grau de insolubilidade em meio aquoso. Tal aspecto pode estar relacionado à permanência dos constituintes originais parcialmente hidrolisados, não atingindo o esgotamento deste material. A quantificação pelo método de Bradford permitiu determinar que a quantidade total de proteínas foram semelhantes para ambas as espécies.

A figura 23 indica que houve dissociação de proteínas em peptídeos de baixo peso molecular e o perfil de arraste pode ser explicado pela presença de subprodutos de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos, constituintes da pele dos peixes AM e SH. É interessante observar que o produto hidrolisado da pele do peixe AM observado no gel da figura 23 parece possuir maior quantidade de proteínas que o material da pele do peixe SH, no entanto, os valores verificados pela dosagem de Bradford são similares. Talvez a composição mais robusta da pele do peixe SH tenha sido um fator de dificuldade à ação enzimática e a consequente liberação das proteínas no processo de hidrólise. É interessante observar que os

ensaios *in vitro* aparentemente exibem maior atividade da pele do peixe AM, frente a atividade do peixe SH indicando que a eficiência da hidrólise deva ser proporcional à compactação do substrato, ou seja, fornecendo maior teor de papaína ou permitindo a hidrólise por maiores períodos para o couro de maior resistência.

No que diz respeito à viabilidade celular de células tratadas com os pulverizados e seus produtos de hidrólise, apresentada no quadro 2, as células da linhagem de macrófagos murinos J774 A1 tratadas com o sobrenadante do hidrolisado da pele do peixe AM apresentaram perda de viabilidade. Para o tratamento com os produtos da hidrólise da pele do peixe SH a maior concentração do sobrenadante implicou na maior perda de viabilidade visualizada, as demais concentrações geraram perdas de até 20% nos tratamentos com o pellet. É importante ressaltar que houve atividade redutora da produção de óxido nítrico sem perda de viabilidade na concentração de 100 µg/ mL chegando a 19%.

Para a linhagem RBL-2H3 foi verificada a perda da viabilidade celular nas maiores concentrações do sobrenadante e na maior concentração do pellet, para o tratamento com produtos da hidrólise da pele do peixe SH houve também maior perda da viabilidade celular nas maiores concentrações do pellet e em todas as concentrações do sobrenadante.

Vale ressaltar que a atividade apresentada pelo material residual (pellet) indica que este produto ainda contém o composto com atividade biológica reforçando que não houve a digestão integral do conteúdo protéico presente no pulverizado da pele do peixe. Com base no exposto, a perda da viabilidade celular apresentada pode ser atribuída a presença de glicosaminoglicanos nos produtos da hidrólise. Os glicosaminoglicanos não são degradados pela enzima sendo liberados no sobrenadante onde se encontram em maiores concentrações. A presença dos glicosaminoglicanos carregados negativamente potencialmente pode quelar sais importantes para a manutenção dos grupos celulares e da mesma forma, podendo provocar desequilíbrio osmótico visto que as células poderão perder sais para o meio extracelular (RODRIGUES *et al.*, 2011). A presença de agregados de glicosaminoglicanos poderia potencialmente interferir dificultando a adesão ao substrato e regulando negativamente citocinas envolvidas na sua sobrevivência (MEREDITH; SCHWARTZ, 1997; FIGUEIRA *et al.*, 2015).

A avaliação de toxicidade oral aguda é a primeira avaliação para fins de determinar o efeito de dose única de um dado composto. O monitoramento diário dos animais durante 14 dias após administração dos pulverizados das peles dos peixes não mostrou qualquer indicio de toxicidade após tratamento. Houve progresso de peso mais vagaroso para o grupo que recebeu a pele do peixe SH, no entanto, não foi verificada diferenças da ingestão alimentar

entre os grupos. Vale ressaltar a ingestão de 2 g de pele de peixes administrada em dois momentos com um intervalo de 1h consistindo em material de constituição proteica e fibrosa, de digestão lenta e pouco calórico. A distensão ocasionada pelo tratamento pode ter impactado na procura por alimento nos primeiros momentos após os tratamentos ocasionando a estagnação do peso dos animais. Vale ressaltar que a figura 21 demonstra que não houve perda de peso dos animais que receberam os pulverizados, uma vez que a perda de peso poderia ser atribuída à algum indício de toxicidade. Referente à avaliação do peso dos órgãos, o grupo SH apresentou variação estatística apenas para o peso absoluto do órgão, mas não em relação ao peso relativo, indicando que esta diferença provavelmente está associada a diferença de peso original entre os animais. Referente aos dados hematológicos, não foram observadas variações significativas entre os parâmetros avaliados. Finalmente, no tocante aos parâmetros bioquímicos, o colesterol se apresentou mais baixo para os animais que receberam os pulverizados da pele dos peixes, entretanto todos os animais avaliados encontravam-se nos parâmetros sugeridos como referência. Igualmente, houve decaimento do indicador fosfatase-alcalina, reduzido no grupo de camundongos que recebeu a pele do peixe SH, no entanto, todos os animais encontravam-se dentro das faixas de normalidade informadas pelo laboratório.

Com base nos dados acima expostos, adicionado ao que há descrito na literatura, no tocante a composição da pele de peixes-porco, e em relação ao seu potencial terapêutico, é factível considerar a hipótese da presença de compostos bioativos envolvidos nos fenômenos aqui observados. Entretanto, não há ainda como precisar os mecanismos de ação envolvidos nas atividades aqui descritas. Da mesma forma, para total segurança sobre o consumo deste produto natural é imprescindível a continuidade dos estudos de toxicidade. *A priori* descartam-se eventos de toxicidade vinculados a esta prática, no entanto, mais estudos são necessários para o entendimento das ações biológicas aqui descritas.

6 Conclusões

Com este trabalho, verificamos atividade de um produto natural de origem animal empregado em nossa MT para fins de amenizar a asma. O produto em questão foi a pele de peixes porco, refugo do comércio da carne, utilizada seca à temperatura ambiente, em chás ou sobre os alimentos;

Este produto natural mostrou ação anti-inflamatória *in vivo* reduzindo o influxo leucocitário, primordialmente eosinofílico, para a cavidade pleural em camundongos no modelo de pleurisia alérgica e no modelo de inflamação pulmonar alérgica, ambos induzidos por OVA;

A avaliação dos lavados pleurais de animais utilizados no modelo de pleurisia alérgica mostrou a redução do exsudado proteico e de quimiocinas como eotaxina-1 e RANTES, mostrando efeitos direcionados à população eosinofílica, no entanto não foi verificada a redução da interleucina IL-5 importante na ativação do eosinófilo e sua diferenciação;

A ação anti-inflamatória dos pulverizados das peles dos peixes se estendeu a nível sistêmico reduzindo a leucometria em sangue periférico e evidenciando sua ação sobre os eosinófilos com redução em até 48% desta população celular;

Os pulverizados das peles dos peixes-porco também mostraram efeito antiedematogênico em modelos de edema de pata induzidos por OVA e histamina;

Não foram verificadas alterações nas populações celulares TCD3 e TCD3/ CD25 dos linfonodos drenantes mais próximos ao local de indução com OVA dos animais utilizados no ensaio de edema de pata estimulados com OVA;

Em ensaios *in vitro* buscando avaliar mecanismos de ação deste produto natural foi feito o ensaio de degranulação de mastócitos β -hexosaminidase para fins de entender se o produto poderia exercer qualquer ação sobre o processo de degranulação de mastócitos, no entanto não foi revelada atividade significativa visto que houve perda da viabilidade celular;

Avaliando mecanismos envolvidos na permeabilidade vascular, foi realizada a dosagem de óxido nítrico em linhagem de macrófagos murinos J774-A1, para fins de verificar se o hidrolisado dos pulverizados das peles dos peixes porco poderiam minimizar a produção deste mensageiro gasoso, verificamos o efeito da pele do peixe AM sem perda da viabilidade celular mostrando outra via de ação anti-inflamatória;

Foi realizado o ensaio de citotoxicidade, onde foi verificada perda da viabilidade celular de ambas as populações utilizadas *in vitro*; no entanto, é sugerido que a perda de viabilidade celular se deve a componentes derivados do processo de hidrólise como os glicosaminoglicanos que podem interferir com a viabilidade dos grupos celulares utilizados;

Finalmente, foi realizado o ensaio de toxicidade oral aguda conforme protocolo de doses fixas da OECD420 e durante o período de avaliação não foram evidenciados sinais tóxicos do consumo destes pulverizados. Houve alteração de peso corporal sem sinais de toxicidade, a ingestão alimentar não mostrou diferenças significativas entre os grupos, referente aos órgãos houve diferença de peso absoluto do fígado para o grupo que recebeu o pulverizado da pele do peixe SH, no entanto, exames hematológicos não mostraram diferenças significativas e as diferenças evidenciadas no exame bioquímico encontravam-se dentro da faixa de normalidade excluindo sinais de toxicidade consequentes da administração dos pulverizados das peles dos peixes AM e SH.

Referências

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABBAS, A. K. *et al.* **ROBBINS patologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 817-824, 2010.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 381-388, 2011.

AHMAD, M. *et al.* Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 508-515, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Natural products from ethnodirected studies: Revisiting the ethnobiology of the zombie poison. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* The current status of ethnobiological research in Latin America: gaps and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 1, p. 72, 2013.

ALVES, R. R. N. Fauna used in popular medicine in Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 1, 2009.

ALVES, R. R. N.; ALVES, H. N. The faunal drugstore: animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, p. 9, 2011.

ALVES, R. R. N. *et al.* Animal-based remedies as complementary medicines in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

ALVES, R. R. N.; OLIVEIRA, T. P. R.; ROSA, I. L. Wild animals used as food medicine in Brazil. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 670352, 2013.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 2, 2005.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. From cnidarians to mammals: the use of animals as remedies in fishing communities in NE Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 259-276, 2006.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zootherapeutic practices among fishing communities in North and Northeast Brazil: A comparison. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 82-103, 2007a.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. M. L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 14, 2007b.

AMRI, E.; MAMBOYA, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 99-104, 2012.

ANDRADE, J. N.; NETO, E. M. C. Primeiro registro da utilização medicinal de recursos pesqueiros na cidade de São Felix, Estado da Bahia, Brasil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 177-183, 2005.

ANEIROS, A.; GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 803, n. 1, p. 41-53, 2004.

ARIAS, A. M. Nombre Científico *Balistes capriscus* Gmelin, 1789 – Ictioterm.es (1998) - Lonja de Conil de la Frontera. Disponível em:
http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=164

BARRETO, M. L *et al.* Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. suppl 1, p. 106-115, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUCE, A. *et al.* **Biologia molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

CAMPOS, H. S. Asma: um grande chat celular (cujo conteúdo ainda não conseguimos entender totalmente). **Pulmão**, v. 14, p. 145-157, 2005.

CAMPOS, H. S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. **Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária**, v. 15, n. 1, p. 47-60, 2007.

CAMPOS, H. S.; CAMARGOS, P. A. M. Broncodilatadores. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 2, p. 60–64, 2012.

CARRAZZA, L. R. *et al.* **Caderno de normas fiscais, sanitárias e ambientais para regularização de agroindústrias comunitárias de produtos de uso sustentável da biodiversidade**. Brasília, DF:ISPN, 2011.

CARVALHO, V. *et al.* Antinociceptive activity of *Stephanolepis hispidus* skin aqueous extract depends partly on opioid system activation. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1221-1234, 2013.

CAVALLI, L. S. *et al.* Fish *Balistescaprisicus* skin extract-induced relaxation in mesenteric arterial bed of rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-220, 2003.

CHEMAS, R. C. Zooterapia no âmbito da medicina civilizada. I. Organoterapia humana e animal *stricto sensu*. In: COSTA-NETO, E. M.; ALVES, R. R. N. (Eds). **Zooterapia: os Animais na Medicina Popular Brasileira**, p 75-102, vol 2, 1st edn. NUPEEA, Recife, PE, Brazil, 2010.

CLAUZET, M.; RAMIRES, M.; BARRELLA, W. Pesca artesanal e conhecimento local de duas populações caiçaras (Enseada do Mar Virado e Barra do Una) no litoral de São Paulo, Brasil. **Multiciência**, v. 4, n. C, p. 1-22, 2005.

COOPER, E. L. Drug Discovery, CAM and Natural Products. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 1, n. 3, p. 215-217, 2004.

COOPER, E. L. eCAM: An emerging linkage with ethnopharmacology? **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 365-366, 2008.

COSTA NETO, E. M. A zooterapia popular no Estado da Bahia: registro de novas espécies animais utilizadas como recursos medicinais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 1639-1650, 2011.

COSTA NETO, E. M.; ANDRADE, J. N. Primeiro registro da utilização medicinal de recursos pesqueiros na cidade de São Félix, Estado da Bahia, Brasil. **Acta. Sci. Biol. Sci.**, v. 27, n. 2, p. 177-183, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.

COSTA-NETO, E. M. Animal-based medicines: Biological prospection and the sustainable use of zotherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 1, p. 33-43, 2005.

COSTA-NETO, E. M.; MARQUES, J. G. W. Faunistic resources used as medicines by artisanal fishermen from Siribinha Beach, state of Bahia, Brazil. **Journal of Ethnobiology**, v. 20, n. 1, p. 93-109, 2000.

COSTA-NETO, E. M.; MOTTA, P. C. Animal Species Traded as Ethnomedicinal Resources in the Federal District, Central West Region of Brazil. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 2, n. 2, p. 24-30, 6 jul. 2010.

CRIADO, P. R. *et al.* Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: Novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.

DA ROSA, C. Traditional Medicine and Complementary/Alternative Medicine in Primary Health Care: The Brazilian Experience. **Primary Care at a Glance - Hot Topics and New Insights**, p.65-82, 2012.

DA SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

DE SOUZA, M. L. R.; GODOY, L. C.; KOZUKI, H. T.; CASACA, J. D. M.; DOURADO, D. M.; JACINTO, M. A. C. Histologia da pele da carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e testes de resistência do couro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1265-1272, 2006.

DHAMI, N. Trends in Pharmacognosy: a modern science of natural medicines. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 4, p. 123-131, 2013.

DIEGUES, A. C. Artisanal Fisheries in Brazil. **International Collective in Support of Fishworkers**. 2006, p. 72. (Samuda Monograph).

DIEGUES, A. C. *et al.* Biodiversidade e comunidades tradicionais no Brasil. **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**, p. 1-30, 1999.

DRAGON, S. *et al.* IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, n. 4, p. L1023-L1029, 2007.

EL-DEIR, A. C. A. *et al.* Ichthyofauna used in traditional medicine in Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-16, 2012.

ESNAULT, S.; KELLY, E. A. Essential Mechanisms of Differential Activation of Eosinophils by IL-3 Compared to GM-CSF and IL-5. **Critical ReviewsTM in Immunology**, v. 36, n. 5, p. 429-444, 2016.

FERRARIS, F. K. *et al.* Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates allergic inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 82-93, 2012.

FERREIRA, F. S. *et al.* Zootherapeutics utilized by residents of the community Poço Dantas, Crato-CE, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 21, 2009.

FIGUEIRA, C. P. *et al.* Leishmania infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. **Scientific Reports**, v. 5, n. 12862, p. 1-12, 2015.

BEMVENUTI, M. A.; FISCHER, L. G. Peixes: morfologia e adaptações. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 31-54, 2010.

FISCHER, L. G.; PEREIRA, L. E. D.; VIEIRA, J. P. **Peixes estuarinos e costeiros**. 2. ed. Rio Grande, 2011. 131 p.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade - metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 256-271, 2000.

FURLONG, E. B. *et al.* Caracterização química de pescados empregados para tratamento de asma brônquica na Região Sul do Rio Grande do Sul Chemical characterization of fish species employed to asthma treatment southern region of Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n.3, p. 415-422, 2006.

GONZÁLEZ, R. P.; LEYVA, A.; MORAES, M. O. Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 24, n. 10, p. 1097-101, 2001.

GUALDI, L. P. *et al.* Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada Murine models for asthma research: An updated critical analysis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 236-242, 2010.

HAKUTA, A. *et al.* Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 88, n. 3, p. 357-364, 2017.

HAMID, Q. *et al.* Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 5, p. 1541-1546, 1991.

HAN, E. H. *et al.* Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1069–1075, 2009.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218-230, 2008.

HUO, J. xin; ZHAO, Z. Study on enzymatic hydrolysis of *gadus morrhua* skin collagen and molecular weight distribution of hydrolysates. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 6, p. 723-729, 2009.

JOLY, C.; VERDADE, M.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista Usp**, v. 89, p. 114-133, 2011.

JOSEPH, J. *et al.* Serum interleukin-5 levels are elevated in mild and moderate persistent asthma irrespective of regular inhaled glucocorticoid therapy. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 4, p. 2–7, 2004.

KAEWRUANG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Molecular and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket as affected by extracting temperatures. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1431-1437, 2013.

KARNJANAPRATUM, S. *et al.* Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 3220-3226, 2016.

KENNETH MURPHY, PAUL TRAVERS, M. W. **Resposta imune inata e adaptativa**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KRICHEN, F. *et al.* Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 283-289, 2015.

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-16, 2013.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins Basic Pathology**. 8. ed. Elsevier, 2008.

LANTZ, C. S. *et al.* Role for interleukin-3 in mast cell and basophil development and in immunity to parasites. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 90-93, 1998.

LARCHÉ, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 3, p. 450-463, 2003a.

LARCHÉ, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 3, p. 450-463, 2003b.

LIMA, P. *et al.* Envenenamento fatal por baiacu (Tetrodontidae): relato de um caso em criança Fatal poisoning caused by puffer fish (Tetrodontidae): report of a case involving a child. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 92-94, 2010.

LIMA, M. C. *et al.* Studies on the mechanisms involved in antigen-evoked pleural inflammation in rats: contribution of IgE and complement. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 61, n. 3, p. 286-292, 1997.

LINDE-MEDINA, M.; MARCUCIO, R. Living tissues are more than cell clusters: The extracellular matrix as a driving force in morphogenesis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2018.

LIU, C.; XUE, Y.; SUN, J. Hydrolyzed Fish Collagen Inhibits Inflammatory Cytokines Secretion in Lipopolysaccharide-Induced HUVECs. **Advanced Materials Research**, v. 1025-1026, p. 570-573, 2014.

LUZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 7, n. 15, p. 145-176, 2005. Supl.

MARTÍN-OROZCO, E.; NORTE-MUÑOZ, M.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 1-18, may 2017.

MARTINS, A. *et al.* Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066-1071, feb. 2014.

MASOLI, M. *et al.* The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 59, n. 5, p. 469-478, 2004.

MAYER, A. M. S. *et al.* Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510-2573, 2013.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 1, p. 69-85, 2007.

MEREDITH, J. E.; SCHWARTZ, M. A. Integrins, adhesion and apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 7, n. 4, p. 146-150, 1997.

MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA (Brasil). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, 2011. 160 p.

_____. **1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura**. Florianópolis: ACEB, 2014. 136 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 38, p.51-546, 2012. Suplemento 1.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes**. 2. ed. Brasília, 2008. 94 p. (Cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase; n. 2, Série A. Normas e Manuais Técnicos).

_____. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

_____. Secretaria de Atenção à Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, 2012. 156 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica, n 31).

MONDO, K. *et al.* Environmental neurotoxins β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements. **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p. 26-32, 2014.

MONTEIRO-NETO, C. *et al.* Associações de peixes na região costeira de Itaipu, Niterói, RJ. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 98, n. 1, p. 50-59, 2008.

MOORE, K. S. *et al.* Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 4, p. 1354-1358, 1993.

MUCCILLO-BAISCH, A. L.; BRUM, D.; ANDRADE, A. Effects of aqueous extract from *Stephanolepis hispidus* on blood pressure in the normal and in L-NAME-induced hypertensive rats. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 6, n. 2, 2007a.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Artmed, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4. ed. John Wiley & Sons, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 255-278, 2014.

NOMAN, A. *et al.* Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 19-28, 2018.

PARK, C. S. *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. **European Respiratory Journal**, v. 12, n. 4, p. 872-878, 1998.

PATRA, D.; SANDELL, L. J. Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 14, 2012.

PAZ, V. a.; BEGOSSI, A. Ethnoichthyology of galviboa fishermen of Sepetiba bay, Brazil. **Journal of Ethnobiology**, v. 16, n. 2, p. 157-168, 1996.

PINTO, M. F.; MOURÃO, J. S.; ALVES, R. R. N. Use of ichthyofauna by artisanal fishermen at two protected areas along the coast of Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 11, n. 1, 2015.

RAMIRES, M. *et al.* The use of fish in Ilhabela (São Paulo/ Brazil): preferences, food taboos and medicinal indications. **Biota Neotropica** v. 12, n. 1, p. 0-9, 2012.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The World Medicines Situation 2011**: traditional medicines: global situation, issues and challenges. 3. ed. Geneva: World Health Organization, 2011. 12 p.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Proposta de um modelo murino de curta duração de resposta pulmonar alérgica aguda sem utilização de adjuvante. **J Bras Pneumol.**, v. 38, n. 5, p. 595-604, 2012a.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Glicosaminoglicanos isolados da pele de palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*): características e implicações biológicas. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 141-148, 2012b.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Purificação, caracterização físico-química e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum - Technology**, v. 33, n. 3, p. 233-241, 2011.

ROJAS, Y. E. T. *Aluterus monoceros* - Fishbase, (2013). Disponível em: http://d1iraxgbwuhpbw.cloudfront.net/tools/uploadphoto/original_filename_uploads/amonoceros.jpg

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The Eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 147-174, 2006.

ROTHENBERG, M. E. *et al.* Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 6, p. 1986-1992, 1988.

SAMPAIO, C. L. S.; NOTTINGHAM, M. C. **Guia para identificação de peixes ornamentais brasileiros – vol 1: espécies marinhas**. Brasília:IBAMA, 2008.205 p.

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Ministério da Saúde. **Portaria SAS/MS nº 1.317, de 25 de novembro de 2013**. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. 2013. p. 81-108.

SILVA, A. L. Da. Animais medicinais: conhecimento e uso entre as populações ribeirinhas do rio Negro, Amazonas, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 3, n. 3, p. 343-357, 2008.

SMITH, E. *et al.* **Bioquímica de Mamíferos**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. **J Bras Pneumol**, v. 38, p. S1-S46, 2012. Supl. 1.

SOUTO, M. W. S. *et al.* Breve revisão sobre uso de fauna medicinal no Brasil : aspectos históricos , farmacológicos e conservacionistas. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 11, n. 2, p. 201-210, 2011.

SOUZA, L. M.; CHAVES, P. T. Atividade reprodutiva de peixes (Teleostei) e o defeso da pesca de arrasto no litoral norte de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 1113-1121, 2007.

SOUZA-MACHADO, A. Asma: um breve histórico de uma doença negligenciada no Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 137–138, 2016.

STELEKATI, E.; ORINSKA, Z.; BULFONE-PAUS, S. Mast cells in allergy: Innate instructors of adaptive responses. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 505-519, 2007.

STILL, J. Use of animal products in traditional chinese medicine: environmental impact and health hazards. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 118–122, 2003.

SUBHAN, F. *et al.* Fish Scale Collagen Peptides Protect against CoCl₂/TNF- α -Induced Cytotoxicity and Inflammation via Inhibition of ROS, MAPK, and NF- κ B Pathways in HaCaT Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

SUFLITA, M. *et al.* Heparin and related polysaccharides: synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 18, p. 7465-7479, set. 2015.

VAN DER VELDEN, V. H. J. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 4, p. 229-237, 1998.

VARRICCHI, G. *et al.* Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n. 2, p. 186–200, 2016.

VÁZQUEZ, J. A. *et al.* Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 747-774, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIANNA, M. *et al.* Descrição da pescaria de Peroá (*Balistes capriscus*) com a utilização do Puçá-Grande no Sudeste do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 2, p. 229-236, 2007.

WHITE, J. *Stephanolepis hispidus*; Planehead Filefish - CalPhotos - Photo Database, (2008). Disponível em:

https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0908+0353

WHO. WHO Traditional Medicine Strategy. **Alternative and Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-78, 2013.

ZASLOFF, M. *et al.* Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15978-15983, 2011.