CARLOS EDUARDO MALAVASI BRUNO

Análise morfológica da nadadeira do tubarão-azul, *Prionace glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii)

São Paulo
2012

CARLOS EDUARDO MALAVASI BRUNO

Análise morfológica da nadadeira do tubarão-azul, *Prionace glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Dra. Rose Eli Grassi Rici

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2696
FMVZ

Bruno, Carlos Eduardo Malavasi
Análise morfológica da nadadeira do tubarão-azul, *Prionace glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii) / Carlos Eduardo Malavasi Bruno. – 2012.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Rose Eli Grassi Rici.

1. Nadadeira. 2. Tubarão. 3. Cartilagem. 4. Tumor. 5. Citometria de fluxo. I. Título.

ERRATA

MALAVASI-BRUNO; C. E. **Análise morfológica da nadadeira do tubarão-azul, *Prionace Glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii).** 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha	T.2812	T.2912
Catalográfica	FMVZ	FMVZ

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise da morfologia e perfil metabólico das nadadeiras do Tubarão Azul, Prionace glauca (Linnaeus, 1758)", protocolado sob o nº 2384, utilizando 10 (dez) cação azul, sob a responsabilidade do(a) Dra. Rose Eli Grassi Rici, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Analisys of the morphology and metabolic profile of fins of the Blue Shark, Prionace glauca (Linnaeus, 1758)", protocol number 2384, utilizing 10 (ten) blue sharks, under the responsibility Dra. Rose Eli Grassi Rici, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 21 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/767
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-775
E-mail: fmvz@usp.b
http://www.fmvz.usp.b

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRUNO, Carlos Eduardo Malavasi

Título: Análise morfológica da nadadeira de tubarão-azul, *prionace glauca*, linnaeus, 1758 (carcharhiniformes: elasmobranchii)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dr._____

Instituição: _____Julgamento_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento_____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____Julgamento_____

Dedicatória

Dedico essa dissertação de mestrado para a minha amada esposa Jéssica L.C. Bruno, que sempre me apoia, e principalmente por ter me ajudado a passar mais essa fase da minha vida acadêmica, sempre demonstrando a paciência e o carinho necessário.

Dedico também ao meu pai, Geraldo G. Bruno "in memoriam", que sempre esteve ao meu lado.

Dedico ainda as minhas eternas "velhinhas" Terezinha "Tetê", Dinorah "Di" e D. Ana "D. Neves" in memoriam, três novas estrelas no céu já com tantas estrelas que tiveram uma importância muito grande na minha vida.

Dedico por fim este trabalho aos milhares de tubarões que são mortos em todo o mundo para o consumo de sua carne e nadadeiras.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todos os Orixás, aos meus pais espirituais Oxóssi e Iemanjá, aos meus padrinhos espirituais Exu Veludo e Pombagira D. Maria Mulambo, que sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço muito a minha orientadora e "mãe intelectual" Dra. Rose Eli Grassi Rici, por me ensinar a ser pesquisador, por todos os ensinamentos, pela confiança, pelas broncas, pelas muitas risadas, por toda sua ajuda, e principalmente por acreditar em mim. Muito Obrigado!!!!!

Agradeço muito o Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, por toda a ajuda nos experimentos, por sempre ter a paciência de me explicar quantas vezes fosse preciso, pelas risadas e por ter me ensinado muito de Bioquímica, Muito Obrigado!!!!!

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Ferreira de Amorim, por todo o carinho, atenção e dedicação, por ter me aceitado como aluno em suas disciplinas, por responder a todas as minhas dúvidas, por me ensinar absolutamente tudo o que sei sobre o maravilhoso mundo dos tubarões e por ter me aceito como mais um dos seus "filhos". Muito Obrigado !!!!!

Agradeço ao Sr. Mário e o Sr. Nobumitsu Doki, da empresa KODEN – Indústria, Comércio, Importação e Exportação LTDA por terem fornecido todas as nadadeiras, sem vocês esse trabalho não seria possível. Muito obrigado!!!!!

A Minha mãe biológica Rita, a minha ama de Leite Silvia, a minha mãe Preta Regina e a minha mãe Japonesa Márcia, que me mostraram que com muita luta e dedicação pode-se conseguir tudo. O Filho de vocês está sendo Negrão!!!!!

A Nicolle, amor do Tio, por sempre me incentivar mesmo sem saber, me perguntar tudo sobre tubarão e me fazer rir muito.

Aos meus sogros Jairo e Irailde, anjos que caíram do céu para me ajudar no momento em que mais precisei, por serem meus ouvintes, por nunca me deixarem desistir e por sempre se empolgarem comigo.

Aos meus cunhados Jejé e Jack por sempre estarem ao meu lado, e me apoiarem, e por me ouvirem sempre, mesmo quando não estão entendendo nada o que estou falando.

Agradeço também aos meus irmãos de coração Danilo e Beatriz "Bia", por toda a paciência comigo nessa fase difícil e por sempre me apoiarem e pelo carinho incondicional.

Agradeço ao meu grande amigo, padrinho de casamento e mais que irmão Thierry Salmon, por toda a ajuda no trabalho e as muitas risadas muito obrigado por sempre estar ao meu lado, "Nous allons en France".

Agradeço, a minha grande amiga e praticamente irmã, Cristiane Cagnoni "Gordinha", por toda a ajuda não só no trabalho, mas sempre, pelas muitas risadas sempre, aos inúmeros chocolates e sorvetes no final da tarde. Muito obrigado por tudo!!!!!

Agradeço, a minha amiga Sônia "Soninha", por ser como uma "mãezona", pelas inúmeras ajudas no trabalho, e me ajudar em todas as dúvidas que tive durante o mestrado, e na confecção deste trabalho.

Agradeço a Sarah "Rock N´Roll" por toda ajuda nesta vida de biólogo pesquisador que não é fácil.

Agradeço a minhas amigas de departamento, Fê "Peixeira" e Éryka "Peixeira", sozinhos, somos apenas peixinhos, porém, nós todos os "Peixeiros" trabalhando juntos somos um cardume.

Agradeço aos meus amigos de departamento João, André, Renata, Juliana (Jú), Barbara (Gaúcha), Leandro, Fernanda (Cetáceos), Silvia, Marcão, Greyson, Wesley, Nicholas (Preto-velho), Luca (Num Rola), Bruno (Mineiro), Amilton, Diego (Maranhão) e Diego Cury (Droopy), pelas inúmeras risadas e ensinamentos.

Agradeço ao Phelipinho e ao André, que me acolheram quando eu era apenas um estagiário e não sabia distinguir um tubarão de uma raia, obrigado por toda a ajuda!!!!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, Manu, Tais, Ronaldo, Álvaro, e principalmente a Myryan (Myryancita, muchas grácias por toda su ayuda, sin usted este trabajo no seria el mismo).

Agradeço aos Funcionários do Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, Maicon, sem você esse trabalho nunca seria feito, obrigado pela

oportunidade e por toda a ajuda no mestrado, a funcionária Jaqueline, pelas conversas risadas, e conselhos e as meninas da limpeza, a Tia Bernar pelas dicas, conversas e carinho.

Agradeço aos professores Alan, José Roberto, Assis, Vicente Borelli e Paula Papa, por todos os ensinamentos, agradeço ainda a Prof. Dra. Maria Angélica Miglino que me acolheu quando estagiário e por me abrir o caminho nas pesquisas com tubarões.

Agradeço a Prof. Dra. Maria Amélia Mazogno, pela ajuda, por sanar todas as dúvidas de biologia, e pelas conversas e risadas.

Agradeço as pós-doutorandas, Paula Fratini, e Rosangela, pela ajuda e por sempre sanarem minhas duvidas nos trabalhos.

Agradeço ao técnico de laboratório Ronaldo, por toda a ajuda na histologia e dicas diárias de laboratório, e por toda a paciência em me ensinar a rotina de um laboratório de histologia. Agradeço também ao técnico de laboratório Ednaldo "Índio" pela ajuda e por sempre estar disposto a me ajudar com os tubarões e pelas inúmeras dicas. Duas pessoas muito importantes para todos os pesquisadores do departamento. Vocês com certeza fazem parte deste trabalho.

Agradeço aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Elza, Gustavo e Helena pela ajuda sempre e pela dedicação e pelas conversas e dicas no trabalho.

Agradeço aos Alunos do Instituto de Pesca de Santos, Roberta, Rodrigo, Caio, Barbara, Lygia, Taís, e Natalia, pelo carinho e atenção prestados sempre que vou ao Pesca. Agradeço também aos funcionários Ocimar e D. Ana, que sempre estão dispostos a me ajudar quando necessário.

Agradeço aos meus queridos e dedicados alunos do Cursinho Comunitário Chico Mendes, em especial ao Nicholas, Rogério, Letícia, Anderson, Fran, Francielen, Stephanie, Bia, Marquinhos, Luzimara, Diego, Aline, Carol, Rafa e Val. Vocês são demais, não me arrependo nunca de dedicar meus sábados a vocês. Agradeço também aos professores Iara e Fábio que me colocaram como Professor neste cursinho que já faz parte de mim. Valeu Galera!!!!!

Agradeço ao futuro Biólogo Tiago, pela ajuda e dedicação e em confiar em mim seus alunos.

Agradeço a Márcia "Chefinha", por toda a ajuda enquanto eu trabalhava e estudava e principalmente minha vida acadêmica e por sempre me incentivar a seguir em frente.

Agradeço ao Thiago por toda a paciência quando eu estudava enquanto trabalhava por mim no Fórum e principalmente pelo incentivo e ideias para pesquisar.

As minhas tias e avós e bisavós do Fórum a qual eu admiro demais, muito obrigado por sempre estarem ao meu lado.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus Tios Gerson e Carolina, meus primos, Daniel, Levi e Ligia, por todo o carinho durante a minha existência, Amo Muito Vocês!!!!!!

Muito Obrigado por me ajudarem a realizar esse sonho!!!!!!

"Le grand requin bleu continue à s'approcher de moi dela façon immuable qui a été celle de son espèce tout au long millénaires."

(Jacques Yves Cousteau)

"Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais. Os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento."

(Charles Robert Darwin)

RESUMO

MALAVASI-BRUNO; C.E. **Análise morfológica da nadadeira do tubarão-azul, *Prionace Glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii)** [Morphological analysis of the blue-fin shark, *Prionace Glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii)]. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

Tubarões e Raias pertencem à classe dos Chondrichthyes, por serem animais que possuem esqueleto cartilaginoso. O Tubarão-azul (*Prionace glauca*), popularmente conhecido como "cação-azul" dentre todas as espécies de tubarão é a mais abundante no ambiente marinho, podendo ser encontrado em toda a parte do mundo. O estudo teve como objetivo estudar a morfologia das nadadeiras do tubarão-azul (*Prionace glauca*) e os efeitos sobre células tumorais "*in vitro* . Os resultados foram obtidos através da microscopia de luz e Citometria de fluxo. Com os caracteres encontrados na analise macroscópica foi possível identificar as nadadeiras obtidas como sendo do Tubarão-azul (*Prionace glauca*). A histologia da cartilagem da nadadeira do Tubarão-azul, demonstrou que é formada de cartilagem hialina, apresentando três regiões distintas, sendo no seu interior formado por condrócitos, na periferia de cartilagem calcificada e nas bordas formada por pericôndrio com a presença de colágeno tipo I,II e III. Os resultados obtidos das amostras do Elemento Radial não evidenciam alterações funcionais, quanto ao armazenamento, transporte e obtenção do suprimento celular, estes são viáveis e satisfatórios. O composto da cartilagem de tubarão para o tratamento de tumor "in vitro" neste estudo sugeriu que o mesmo apresenta uma atividade anti-tumoral significativa. Mostrou efeito tóxico sobre os tumores de mama murina (TAE) e tumor de mama canino (TMC) em baixas concentrações, não apresentando efeito tóxico nas células de fibroblasto nas mesmas concentrações.

Palavras-chave: Nadadeira. Tubarão. Cartilagem. Tumor. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

MALAVASI-BRUNO; C.E. **Morphologicalanalysisofthefin in blue-shark, *Prionace Glauca*, Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii)** [Análise morfológica da nadadeira do tubarão-azul,*Prionace Glauca*,Linnaeus, 1758 (Carcharhiniformes: Elasmobranchii)] 2012. 96f.Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

Sharks and rays belong to the Chondrichthyes Class, once they have cartilaginous skeleton. The blue shark (*Prionaceglauca*), popularly known as "blue-cation", among all shark species is the most abundant in the marine environment and can be found everywhere in the world. This study aimed to study the fin morphology in the blue shark (*Prionaceglauca*) and its effects on "in vitro" tumor cells. The results were obtained using light microscopy and flow cytometry. Using the gross morphology we confirm that the fins belonged to the blue shark (*Prionaceglauca*). The fin cartilage of the blue shark was formed of hyaline cartilage. It showed three distinct regions with chondrocytes inside, calcified cartilage in the periphery, and perichondrium with collagen type I, II and III in the margins. The results obtained from the Radial Element not showed functional changes as storage, transport and cellular supplies obtaining, they were feasible and satisfactory. The use of shark cartilage compound for the treatment of "in vitro" tumor cells suggested that it showed a significant anti-tumor activity. It showed a toxic effect on murine breast tumors (MBT) and canine breast tumor (CBT) at low concentrations, with no significant toxic effect on fibroblast cells using the same concentrations.

Keywords: Fin. Shark. Cartilage.Tumor.Flowcytometry.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida do Tubarão azul (*Prionace glauca*). A: Margem anterior; B: Comprimento da base; C: Comprimento total; D: Altura.....48

Figura 2 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida descarnada do Tubarão azul (*Prionace glauca*). A: Margem anterior; B: Comprimento da base; C: Comprimento total; D: Altura 49

Figura 3 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida íntegra do Tubarão azul (*Prionace glauca*). A: Epiderme; B: Raios; C: Ponta livre da nadadeira dorsal 50

Figura 4 - Vista ventral da nadadeira dorsal semiúmida íntegra do Tubarão azul (*Prionace glauca*). A: Epiderme; B: Derme; C: Musculatura; D: Elemento Radial; E: Camada grossa de Epiderme..51

Figura 5 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida descarnada do Tubarão azul (*Prionace glauca*). A: Ponta livre da nadadeira; B: Raios Dérmicos; C: Elemento Radial; D: Membrana que interliga os raios dérmicos; E: Divisão entre o elemento radial e o raio dérmico; F: Membrana que interliga os elementos radiais 52

Figura 6 - Fotomicroscopia da cartilagem da nadadeira do Tubarão-azul (*Prionace glauca*), utilizando a técnica de Hematoxilina Eosina (HE). A: Pericondrio, Cartilagem Calcificada e Condrócito; B: Pericondrio, Cartilagem Calcificada (cc) e Condrócito (c); C: Dois tipos de pericôndrio e condrócitos; D:Pericondrio e condrócito; E: Pericôndrio F: Condrócitos (trocar foto) 54

Figura 7 - Fotomicrografia da cartilagem da nadadeira dorsal do Tubarão-azul (*Prionace glauca*). Coloração de pricrossirius Red 56

Figura 8 - Morfologia (tamanho e granulosidade) das células de Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão Azul (*Prionce glauca*). A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3 e D: Amostra 4 58

Figura 9 - Morfologia (tamanho e granulosidade) das células de Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão Azul (*Prionce glauca*). A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3 e D: Amostra 4..... 59

Figura 10 - Histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial do Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionce glauca*). A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4 62

Figura 11 **-** Histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial do Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionce glauca*). A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4..... 64

Figura 12 - Ciclo Celular do Elemento Radial da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*). A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4 66

Figura 13 - Ciclo Celular dos Raios Dérmicos da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*). A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4 68

Figura 14 - Cultura de células de FN-1, 24 horas após o tratamento com o CNT. A: Controle; B: 44 μg/mL; C: 22 μg/mL; D: 11 μg/mL; E: 5,5 μg/mL; F: 2,75 μg/mL; G: 1,37 μg/mL; H: 0,68 μg/mL; I: 0,34 μg/mL; J: 0,17 μg/mL. 71

Figura 15 - Cultura de células de Tumor de mama murina (TAE), 24 horas após o tratamento com o CNT. A: Controle; B: 44 μg/mL; C: 22 μg/mL; D: 11 μg/mL; E: 5,5 μg/mL; F: 2,75 μg/mL; G: 1,37 μg/mL; H: 0,68 μg/mL; I: 0,34 μg/mL; J: 0,17 μg/mL..... 73

Figura 16 - Cultura de células de Tumor de mama de cão (TMC), 24 horas após o tratamento com o CNT. A: Controle; B: 44 μg/mL; C: 22 μg/mL; D: 11 μg/mL; E: 5,5 μg/mL; F: 2,75 μg/mL; G: 1,37 μg/mL; H: 0,68 μg/mL; I: 0,34 μg/mL; J: 0,17 μg/mL..... 75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de barras das medidas e desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial do Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001). 61

Gráfico 2 - Gráfico de barras das medidas e desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial do Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)..... 63

Gráfico 3 - Fases do Ciclo celular do Elemento Radial da Nadadeira de Tubarão, teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)..... 65

Gráfico 4 - Ciclo Celular dos Raios Dérmicos, teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)..... 67

Gráfico 5 - Curva padrão da proteína encontrada no Composto da Nadadeira de Tubarão..... 69

Gráfico 6 - Valor da diluição do composto CNT para a obtenção da concentração em µg/mL...69

Gráfico 7 - Concentração de IC 50% do Composto da Nadadeira de Tubarão aplicado em células de Fibroblastos FN1 70

Gráfico 8 - Concentração de IC 50% do Composto da Nadadeira de Tubarão aplicado em células de Tumor de mama murina (TAE) 72

Gráfico 9 - Concentração de IC 50% do Composto da Nadadeira de Tubarão aplicado em células de Tumor de mama canino 74

Gráfico 10 - Ciclo celular das células de tumor de mama murina tratado com o Composto da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA. (***p < 0.001; ** p<0,01; *p<0,05). 77

Gráfico 11 - Ciclo celular das células de Tumor de mama canino (TMC) tratado com o Composto da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA. (***p < 0.001; ** p<0,01; *p<0,05). 78

Gráfico 12 - Produção de radicais livres em células de Adenocarcinoma de mama murina após 24 horas de tratamento com o Composto da Nadadeira Dorsal do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)..... 79

Gráfico 13 - Produção de radicais livres em células de Tumor de mama de cão após 24 horas de tratamento com o Composto da Nadadeira Dorsal do Tubarão Azul (*Prionace glauca*)..... 80

Gráfico 14 - Produção de radicais livres em células de FN-1 após 24 horas de tratamento com o Composto da Nadadeira Dorsal do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA. (***p < 0.001)..... 81

LISTAS DE ABREVIAÇÕES

AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
APAF-1	Apoptotic protease fatod ativador de 1
BAX	Proteinas pró-apoptóticas
BAD	Proteinas pró-apoptóticas
BCL-2	Proteinas anti-apoptótica , libera citocromo C
CNT	Composto da nadadeira de tubarão
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Oxigenio
FN-1	Fibroblastos
GSH	Glutationa
LPO	Lipo-peroxidacao
LDL	Lipoproteina de Baixa Intensidade (Low density lipoprotein)
MDA	Malonaldeido
MTT	Sal de tetrazólio [brometo3-(4,5-dimetiliazol-2-ila)-2,5-difeniltrazol
TAE	Adenocarcinoma de mama murina
TMC	Adenocarcinoma de mama canino
TNF	Fator de Necrose Tumoral
RL	Radicais Livres

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 OBJETIVOS 23

2.1 OBJETIVOS GERAIS 23

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3 REVISÃO DE LITERATURA 24

3.1 CLASSIFICAÇÃO DOS TUBARÕES 24

3.2 BIOLOGIA DO TUBARÃO-AZUL (*Prionace glauca*) 24

3.3 NADADEIRAS DE TUBARÃO 27

3.4 TECIDO CARTILAGINOSO 27

3.5 TERAPIA COM A CARTILAGEM DE TUBARÃO 30

3.6 MÉTODO DA CITOMETRIA DE FLUXO E CICLO CELULAR 33

3.7 TAMANHO E GRANULOSIDADE CELULAR 37

3.8 MÉTODO COLORIMÉTRICO – MTT 38

3.9 RODAMINA 123 39

3.10 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) 40

4 MATERIAL E MÉTODO 42

4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA 42

4.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA 42

4.2.1 Fixação e processamento das amostras para microscopia de luz (paraplast embedding media – paraplast plus, oxford lab., usa) 43

4.3 COMPOSTOS DA CARTILAGEM 43

4.4 ANALISE DA QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DO COMPOSTO DA CARTILAGEM PELO MÉTODO BRADFORD 44

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT COMPOSTO DA CARTILAGEM 44

4.6 DETERMINAÇÃO FASES DO CICLO CELULAR VIAS DE MORTE CELULAR E ATIVIDADE CELULAR DA NADADEIRA DO TUBARÃO 45

4.7 CULTURA CELULAR DOS TUMORES E FIBROBLASTOS 45

4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DO CULTIVO CELULAR TRATADA COM COMPOSTO DA NADADEIRA DO TUBARÃO 46

4.9 DETERMINACAO *IN VITRO* DE PRODUTOS DE RADICAIS PEROXIDADOS DOS LIPÍDICOS POLIINSATURADOS (LPO) DO TRATAMENTO 47

4.10 ANALISE ESTATÍSTICA 48

5 RESULTADOS 48

Os resultados abaixo se referem às metodologias utilizadas para a realização deste estudo 49

5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA 49

5.1.1 Morfometria 49

5.1.2 Anatomia 51

5. 2 MICROSCOPIA DE LUZ 55

5.3 CITOMETRIA DE FLUXO 60

5.3.1 TAMANHO CELULAR E GRANULOSIDADE DAS CÉLULAS DA CARTILAGEM DE TUBARÃO 60

5.3.1.1 Elemento radial 60

5.3.1.2 Raios dérmicos 61

5.4 POTENCIAL ELÉTRICO E FUNCIONAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL (RODAMINA 123) DA CARTILAGEM DO TUBARÃO 63

5.4.1 Elemento radial 63

5.4.2 Raios dérmicos 65

5.5 CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DE CARTILAGEM DA NADADEIRA DE TUBARÃO 67

5.5.1 Elemento radial 68

5.5.2 Raios dérmicos 70

5.6 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO COMPOSTO DA NADADEIRA DE TUBARÃO ATRAVÉS DO MÉTODO DE BRADFORD 72

5.7 TESTES DE TOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT DO COMPOSTO DA CARTILAGEM DA NADADEIRA DE TUBARÃO IC 50% 74

5.7.1 Em células de fibroblastos (FN1) 74

5.7.2 Em células de adenocarcinoma de mama murina (TAE) 76

5.7.3 Em células de Tumor de mama canino(TMC) 78

5.8 CICLO CELULAR 80

5.8.1 Tumor de mama murino (TAE) tratado com o composto da nadadeira de tubarão 80

5.8.2 Tumor de mama canino (TMC) 81

5.9 PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES (LIPOPEROXIDAÇÃO – LPO) 83

5.9.1 Tumor de mama murina (TAE) 83

5.9.2 Tumor de Mama Canino (TMC) 84
5.9.3 Fibroblastos FN-1 85
6 DISCUSSÃO 87
7 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 91

1 INTRODUÇÃO

Tubarões e Raias pertencem à classe dos Chondrichthyes, por serem animais que possuem esqueleto cartilaginoso. (SZPILMAN, 2000). O Tubarão-azul (*Prionace glauca*), popularmente conhecido como “cação-azul” dentre todas as espécies de tubarão é a mais abundante no ambiente marinho, podendo ser encontrado em toda a parte do mundo (NAKANO; SEKI, 2002; QUAGGIO et al.,2008; LEGAT; VOOREN, 2008). São mais comuns na região da plataforma continental, próximo a praias, em águas superficiais (KOTAS, 2010).

São espécies de tamanhos relativamente grandes podendo chegar até 3 metros de comprimento total quando adultos em ambos os sexos (KOHLER, 2002). São facilmente capturados por embarcações que operam em alto mar (NAKANO; SEKI, 2002; QUAGGIO et al., 2008). Principalmente em pescarias de grandes navios nos Oceanos Pacíficos e Atlântico, onde geralmente já chegam mortos (CAMPANA et al., 2009). O tubarão azul é fonte de alimentação no Brasil e em alguns países da América do Sul, geralmente vendidos em postas em mercados e feiras livres (CAMPANA et al., 2009).

A cartilagem de tubarão é utilizada como matéria prima na fabricação de medicamentos considerados como terapia alternativa, para o tratamento de diferentes patologias entre elas o câncer, usado também como prato exótico na culinária asiática, por ser considerada uma iguaria afrodisíaca (NAKANO; SEKI, 2002), na Ásia, para consumo humano como complemento mineral tradicional e natural como fármacos (BÁEZ et al., 2001; HERNÁNDEZ, 2010).

Cartilagem de tubarão tem sido um complemento popular utilizada em intervenções na medicina alternativa. Isso se deve pelo fato de que o tubarão é popularmente conhecido pelo fato de que os tubarões raramente produzem algum tipo de câncer, por ser um animal cujo esqueleto é constituído unicamente de tecido cartilaginoso (LOPRINZI et al.; 2005).

Diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a cartilagem de tubarão possui um papel importante na prevenção da propagação do câncer devido sua capacidade de inibir a angiogênese (MEJIA; DIA, 2010). Estudos também demonstram que a

cartilagem de tubarão também é eficaz no tratamento de psoríase onde a cartilagem de tubarão age como uma estratégia terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias (DUPONT et al.; 1998).

Uma vez que a cartilagem é um tecido avascular, foi levantada a hipótese de que podem existir fatores encontrados na cartilagem que inibem a formação de vasos sanguíneos. Também existem estudos baseados na aplicação da cartilagem de tubarão no tratamento de Sarcoma de Kaposi administradas por via oral (HILLMAN et al.; 2001).

No estudo foram utilizadas 10 nadadeiras dorsais integras do Tubarão-azul, *Prionce glauca*, e 10 nadadeiras dorsais descarnadas semiúmidas, foram feitas as analises macroscópicas como as medidas básicas, segundo COMPAGNO (1989), foram feitas as analises histológicas utilizando as colorações de Hematoxilina e Eosina e a coloração de Picrossiríus Red. Foram feitas analises de Citometria de fluxo para o ciclo celular das células da cartilagem da nadadeira, bem como o potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial com o marcador Rodamina 123. Foram feitos também o método colorimétrico de MTT e o Bradford para a quantificação das proteínas contidas na cartilagem da nadadeira sem o tratamento e após tratamento.

O projeto teve como objetivo estudar a morfologia das nadadeiras do tubarão-azul (*Prionace glauca*) e os efeitos sobre células tumorais “*in vitro*”.

2 OBJETIVOS

Os objetivos abaixo foram divididos em objetivos gerais e específicos.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a morfologia das nadadeiras do tubarão azul (*Prionace glauca*) e o efeito sobre células tumorais "*in vitro*".

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise macroscópica e morfométrica das nadadeiras;
- Análise através da microscopia de luz;
- Análise morfológica da população celular, fases do ciclo celular e potencial elétrico mitocondrial das células por citometria de fluxo;
- Análise da citotoxidade das nadadeiras "*in vitro*".

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DOS TUBARÕES

Tubarões em geral são denominados de Elasmobrachii, devido suas aberturas branquiais em forma de fenda anatomicamente localizada na lateral do animal, na região mais próxima a cabeça (SZPILMAN, 2000).

Os tubarões assim como as raias pertencem à ordem Selachii. Diferenciando-se uns dos outros quanto aos hábitos e anatomia (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006).

Os elasmobrânquios têm uma historia evolutiva de mais de 400 milhões de anos, com várias adaptações ao seu favor como órgãos sensitivos e complexos modos reprodutivos (CARRIER et al., 2004).

A maioria dos tubarões são predadores ativos com corpos fusiformes, caudas grandes e fortes. Possuem nadadeiras pareadas que apresentam bases restritas. Ao contrário dos peixes ósseos, os tubarões possuem fendas branquiais posicionadas lateralmente. (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006).

Os elasmobrânquios têm uma historia evolutiva de mais de 400 milhões de anos, com várias adaptações ao seu favor como órgãos sensitivos e complexos modos reprodutivos (CARRIER et al., 2004).

3.2 BIOLOGIA DO TUBARÃO-AZUL (*PRIONACE GLAUCA*)

O Tubarão azul é classificado como sendo da classe dos Chondrichthyes por serem animais de esqueleto cartilaginoso. Subclasse elasmobranchii, por possuírem fendas branquiais. Ordem Carcharhiniformes, Familia Carcharhinidae, Genero Prionace, Espécie *Prionace glauca* (NAKANO; SEKI, 2003).

O *Prionace glauca* é a espécie de tubarão mais abundante no ambiente marinho, é considerada uma espécie oceânica circunglobar, ou seja, frequenta águas tropicais e subtropicais (NAKANO; SEKI, 2002; QUAGGIO et al., 2008; LEGAT; VOOREN, 2008). É uma espécie altamente migratória, que podem variar desde a plataforma continental à região pelágica, possui padrões complexos relacionados com a reprodução e distribuição de suas presas (KOTAS et al., 2010; QUAGGLIO et al., 2008) é o tubarão mais abundante na costa brasileira (HAZIN; LESSA, 2005), sendo comumente capturado na pesca de espinhel de atum e espadarte na Região Sul do Brasil e pincipalmente na Região de Santos, Sudeste do país (VASKE-JUNIOR; RINCÓN-JUNIOR, 1998; HAZIN; LESSA, 2005).

O Tubarão-azul é fonte de alimentação no Brasil e em alguns países da América do Sul, este tubarão já chega morto nas capturas de pescarias (CAMPANA et al., 2009).

Muitas vezes ao içarem a rede, é comum a presença de algumas espécies de peixes que se enroscam tais como o tubarão azul e o peixe prego, que chega com algumas mordidas, indicando o oportunismo do tubarão, que predam animais fisgados por espinhel (VASKE-JUNIOR; RINCÓN-JUNIOR, 1998). O tubarão azul é facilmente capturado por embarcações que operam em alto mar (NAKANO; SEKI, 2002; QUAGGIO et al., 2008). Principalmente em pescaria de grandes navios nos Oceanos Pacíficos e Atlântico (CAMPANA et al., 2009).

Pode ser encontrado em profundidades de 150m a 400m (LEGAT; VOOREN, 2008; KOTAS, 2010), com uma migração nictimeral vertical para cada animal, em temperaturas de 5º C a 27º C, conforme a latitude e profundidade onde é encontrado (NAKANO; SEKI, 2002; WALSH; KLEIBER, 2001; VASKE-JUNIOR; RINCÓN-FILHO, 2008;). A relativa abundância desta espécie diminui em águas equatoriais (QUAGGLIO et al., 2008), segundo Vaske-Junior e colaboradores (2009), são encontrados próximos a praia, em águas superficiais.

Possui alimentação generalizada, porém com preferência a cefalópodes, teleósteos e baiacu (MAZZOLENI; SCHWINGEL, 2002; NAKANO; SEKI, 2002), podendo eventualmente comer pássaros e mamíferos marinhos em decomposição (BORNATOWSKI et al., 2008; VASKE-JUNIOR et al., 2009;), sendo assim, considerados animais oportunistas (VASKE-JUNIOR et al., 2009). É considerado,

quando adultos, topo de cadeia alimentar, porém quando jovens podem ser predados por tubarões maiores ou mamíferos marinhos (NAKANO; SEKI, 2002).

As características das idades dos tubarões são verificadas através da frequência do tamanho, tais como: registros feitos em cativeiros, tempos de substituição dos dentes, marcas de espinhas e vértebras. A estimativa de longevidade é de 21 a 26 anos de idade para machos e de 15 anos para as fêmeas (SKOMAL; NATANSON, 2002; NAKANO; SEKI, 2002). O crescimento máximo desta espécie é de aproximadamente 3 metros para ambos os sexos (KOHLER, 2002).

Podendo variar conforme a região, quantidade de alimento disponível e a intensidade de sua predação (SCHWINGEL; MAZZOLENI, 2004). Entre as latitudes de 23º e 38º S e 29º e 52º W, sofre uma variação em seu tamanho, os de maior porte são encontrados com maior frequência em latitudes menores, entre 23º e 32º S, regiões estas com maior temperatura. Os juvenis são concentrados em latitudes maiores que 32º S, em águas com temperatura superficial menor que 18º S (KOTAS et al., 2010).

Tubarões juvenis não realizam grandes migrações até que alcançam um tamanho aproximado de 130 cm, permanecendo em zonas especificas denominada de “zona de cria” (QUAGGLIO et al., 2008). Sendo considerados juvenis quando possuem o tamanho de 191 cm de comprimento furcal (C.F.), idade aproximada entre 1 e 5 anos (SKOMAL; NATANSON, 2002).

Possuem quando adultos, seu corpo alongado e delgado, coloração azulada, focinho alongado, nadadeira ventral larga (NAKANO; SEKI, 2002). Sua nadadeira peitoral possui margem anterior e posterior retas, a margem anterior é mais larga que a base. A nadadeira dorsal é em forma de “V”, com a margem anterior reta e a posterior curvada, de coloração azul escura e marcas de fibras, que compõem a nadadeira internamente, a nadadeira caudal possui um lóbulo superior maior que a inferior, é de coloração azul escura, sem quilhas laterais (HERNÁNDEZ et al., 2009). Espécie capturada por navios pesqueiros na região do Espírito Santo, região Sudeste do Brasil (FREITAS NETTO et al., 2009) e próximo ao porto de Itajaí, Santa Catarina (MAZZOLENI; SCHWINGEL, 1999).

3.3 NADADEIRAS DE TUBARÃO

As nadadeiras de tubarão são utilizadas como prato exótico na culinária asiática, por serem consideradas uma iguaria afrodisíaca (NAKANO; SEKI, 2002), acelerando assim o processo de caça de tubarões de todas as espécies. Muitas vezes apenas as nadadeiras são extraídas e o animal é jogado ainda vivo no oceano (HERNÁNDEZ et al., 2009; SOLIAR, 2005).

É muito utilizada na Ásia, por ser vendida seca para consumo humano e também utilizada como complemento da medicina tradicional e natural como fármacos (BÁEZ et al., 2001; HERNÁNDEZ, 2010).

No tubarão azul, a primeira nadadeira dorsal localiza-se quase ao meio do animal, e a segunda nadadeira dorsal localiza-se bem próximo a sua nadadeira caudal (NAKANO; SEKI, 2002).

A nadadeira dorsal dos tubarões é composta de partes moles, segmento basal simples cartilaginoso, ancoradas nas linhas médias do tronco do animal (COMPAGNO, 1984). É constituída por massas de fibras colágenas continuas, cartilagem e músculos radiais que estabilizam a nadadeira (SOLIAR, 2005). Possuem músculos radiais distais que saem desde seu corpo que se apoiam a base do corpo do tubarão (HAMLETT, 1999).

3.4 TECIDO CARTILAGINOSO

O tecido ósseo, entre os peixes, é encontrado apenas nos peixes ósseos e em todos os demais vertebrados. O osso é composto de uma densa substância intercelular orgânica e depósitos de substância mineral. Os ossos podem substituir tecido cartilaginoso preexistentes, originando os osteoblastos, que após sua maturação, convertem-se em osteócistos. Porém isso não se aplica aos peixes cartilaginosos como tubarões, raias e quimeras (STORER et al., 2003).

A cartilagem do tubarão é diferente dos ossos de outros peixes e de cartilagens de outros vertebrados. Quanto à calcificação é igual ao dos ossos, porém quando visto ao microscópio existem algumas diferenças, cartilagens são menos densas e mais flexíveis que os ossos (SPRINGER; GOLD, 1989).

Para os tubarões, o esqueleto cartilaginoso é vantajoso, pois a cartilagem é menos densa e mais elástica do que o osso, proporcionando ao animal uma vantagem quanto a flutuabilidade e flexibilidade (SPRINGER; GOLD, 1989).

As cartilagens são formadas por uma substância celular resistente, porém elástica, que é secretada por pequenos grupos de células cartilaginosas que ficam embebidas dentro delas e estão recobertas por pericôndrio fibroso (STORER et al., 2003).

Os peixes cartilaginosos possuem seu endoesqueleto formado por cartilagem embrionária durante toda sua vida. Esta cartilagem nunca será trocada por osso, porém as vezes ocorrem depósitos de sais de cálcio que são depositados na cartilagem para que ocorra um fortalecimento do tecido (DORIT et al., 1991; STELL, 1992).

A calcificação da cartilagem no corpo das vertebras é uma característica bem conhecida da coluna vertebral dos tubarões e corresponde a deposição de sais de cálcio que é produzido antes do deslocamento da cartilagem para osso como ocorre nos ossos das extremidades de tetrápodes imaturos. Os mais importantes depósitos de tecido mineralizado são produzidos nas raízes dos dentes, nas bases dos dentículos que se incrustam na pele da mandíbula, e nas nadadeiras (DANIEL, 1934; STELL, 1992).

Algumas espécies de tubarão apresentam uma massa extremamente densa e irregular da cartilagem calcificada, compostas de forma compactadas, nódulos calcificados em várias regiões do esqueleto do animal. Estas hipercalcificações são análogas às hiperosteose que ocorre em peixes ósseos. Geralmente os tubarões imaturos faltam estruturas hipercalcificada enquanto que os adultos as possuem ocorrendo entre outras na Ordem Carcharhiniformes (COMPAGNO, 1984).

Em algumas espécies de tubarão são encontradas tecidos mineralizado formato basicamente de apatita na forma de cálcio que se estabelecem em placas calcificadas na periferia da massa celular. Estes grupos de células possuem um ponto de origem

central na qual se proliferam e parecem estar em constante processo de renovação. Este tecido é encontrado no crondocrânio, mandíbula, arcos branquiais, vertebras e nadadeiras (STELL, 1992).

Nos Chondrichies, a cartilagem encontrada é a hialina, de coloração branco-azulada, vista em microscopia ótica é translucida e homogênea. Tem em sua constituição uma significativa porção de fibras de colágenos muito finos, com aproximadamente 10 a 20 nm de diâmetro. Este tipo de cartilagem também é encontrado nos embriões de todos os vertebrados e nos esqueletos cartilaginosos (STORER et al., 2003).

A cartilagem hialina é a cartilagem encontrada em todos os embriões dos vertebrados e também são encontrados nos peixes cartilaginosos. Essa cartilagem possui uma considerável elasticidade e quando vista macroscopicamente tem uma aparência branco-azulado e um pouco translucido. Este tipo de tecido também é encontrado nos humanos na região do nariz e da traquéia (BOOLOOTIAN; STILES, 1981).

A cartilagem de tubarão é constituída por células emparelhadas ou aglomerados de células chamados de condrócitos, condroblastos e condroclastos, e uma matriz extracelular que constituem componentes fibrilares e não fibrilares, assim como em outros vertebrados (SPRINGER; GOLD, 1989; BÁEZ et al, 2001).

Os condrócitos são responsáveis pela manutenção da matriz (BUCKWALTER; MANKIN, 1998), através do controle da produção e renovação de seus componentes (colágeno, proteoglicanas e proteinas não colágenas), sendo altamente influenciados por citocinas, fatores de crescimento, sinais elétricos e mecânicos. A renovação da matriz depende da capacidade dos condrócitos em detectar alterações na composição macromolecular e organização da matriz, e em resposta através da síntese de tipos e quantidades adequadas de novas moléculas (BUCKWALTER; MANKIN, 1998).

Sua forma e concentração volumétrica mudam em função da profundidade na cartilagem articular, parecendo estar relacionadas com a estabilidade mecânica da matriz (Wu; Herzog, 2002). Segundo Buckwalter e Mankin, (1998) e Huber et al., (2000), as propriedades mecânicas e biológicas da cartilagem articular, dependem fundamentalmente da interação entre os condrócitos e a matriz.

Em vertebrados considerados superiores, a cartilagem é constituída de 90% de colágeno tipo II e apenas 10% de colágeno tipo I. Porém nos tubarões, sua cartilagem é composta de 66% de colágeno de tipo II e de 33% de colágeno do tipo I (BÁEZ et al., 2001).

O colágeno é uma proteína alongada, sendo mais abundante no organismo humano, constituindo 25% das proteínas do corpo, assumindo estruturas, funções e reações diferentes de acordo com sua localização no tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O colágeno tipo I está presente na derme, aponeurose, ossos e tendões, são produzidos pelas células de fibroblastos, possuem fortes ligações entre suas fibrilas que atingem seu grau máximo nos tendões. O colágeno tipo I possui a função de resistir a tensões (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Neste tipo de colágeno, as fibrilas se agrupam formando uma camada espessa que frequentemente se associam, formando feixes de fibras, com até 20 µm de diâmetro, constituindo as fibras de colágeno do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O colágeno tipo II é encontrado nas cartilagens e associa-se com as proteoglicanas que contém condroitinsulfato, emprestando uma caracteristica de compressibilidade reversível devido à alta hidrofilia que apresentam, funcionando como uma esponja que perde água quando comprimida e volta a sua forma normal com a adição de água. Importante característica para articulações sujeitas a pressões. Esse tipo de colágeno é produzido pelos Condrócitos, e possui a função de resistir a pressão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.5 TERAPIA COM A CARTILAGEM DE TUBARÃO

A cartilagem de tubarão é considerada como fonte natural no combate a angiogenese. Este material tem sido utilizado como tratamento de câncer, psoríase, artrose, esclerose sistêmica progressiva, neurovascular, glaucoma e outras patologias

que estão relacionadas com a angiogênese. Ainda, resultados anteriores sugerem que a cartilagem de tubarão também contém ação antiinflamatória (BARGAHI; CHADEGANI, 2008).

O extrato da cartilagem de tubarão exerce sua propriedade de angiogênese através da inibição da MMP (metaloprotease de matriz), atividade das células endoteliais e do VEGF (Fator de crescimento vascular da endotelial), mediada por sinalizações e ativação das células endoteliais específica de atividades pró-apoptóticas. A cartilagem de tubarão demonstra um poder de inibição de células endoteliais e o desenvolvimento e novos vasos sanguíneos, por conter proteínas de baixo peso molecular de massa, porém com uma atividade anti-angiogênica potente (BARGAHI; CHADE, 2008).

A terapia anti-angiogênica pode melhorar a sobrevida de pacientes com câncer (LU et al., 2010). Segundo Zheng et al. (2007). O extrato bruto da cartilagem de tubarão inibe significativamente a angiogênese e a migração celular. Estudos sugerem que o polipeptídeo PG 155 retirado da cartilagem do tubarão azul (*Prionace glauca*), pode ser um dos principais componentes responsável pela atividade anti-angiogênica, sendo possível que as espécies de tubarão, bem como seu habitat podem ser responsáveis pela composição dos polipeptideos encontrados na cartilagem do tubarão (ZHENG et al., 2007).

O efeito protetor dos fatores de crescimento como de outras moléculas já foi discutido por Raff (1992), onde ele levanta a teoria de que as células tendem a morrer e sua morte é evitada através do efeito parácrino de sinais produzidos por outras células, sendo um mecanismo dose dependente. As células de maior proliferação, mas sem estímulo suficiente entrariam em apoptose. Esse mecanismo é um modo simples de controlar a proliferação celular, e promove a seleção natural (células com maior quantidade de receptores para os fatores de crescimento). Por outro lado, esta teoria da seleção natural explica a progressão de tumores encontrados em outros tecidos.

A progressão do ciclo celular depende de ciclinas e estas dependem de quinases (CDKs) que agem em conjunto no início das fases G1-S e G2-M. Para evitar a proliferação anormal, os complexos ciclinas-CDK são precisamente regulados por duas famílias inibidoras do ciclo celular que impedem a sua atividade catalítica, que incluem

as proteínas INK4α, vinculadas somente com as quinases CDK-4 e CDK-6, que são específicas para o início da fase G1. A segunda família de inibidores é composta por proteínas Cip/Kip, como P21 e P27 que inibem todos os complexos ciclina-CDK e não é fase-específicas (COQUERET, 2003).

A manutenção da homeostasia tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios, entre os quais figura a Morte Celular Programada (MCP), sinônimo de apoptose. O termo apoptose ou MCP designa forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em consonância com a remoção de células lesadas, senescentes ou imprestáveis, sem alteração do microambiente celular (PAROLIN; REASON, 2001). Os corpos apoptóticos e as células sofrendo MCP são prontamente reconhecidos como sendo inviáveis e são digeridas por fagócitos para a reciclagem de seus componentes (TAYLOR et al.,2008).

A célula bioquimicamente é observada a externalização da fosfatidilserina (FS), um fosfolipídio de membrana, clivagem proteolítica de um número variado de substratos por proteases denominadas de caspases (MARTIN; GREEN,1995) e a condensação nuclear seguida pela hidrolise internucleossomal do DNA formando fragmentos múltiplos de 200 pares de base (ZIMMERMAN et al., 2001). As redes do complexo de Golgi, do reticulo endoplasmático e das mitocôndrias sofrem uma fragmentação relevante para o processo, pelo fato que o comprometimento da mitocôndria, por exemplo, leva a liberação da proteína intermembrana chamada citocromo C que por sua vez é responsável pela montagem do complexo ativador de caspases chamado de apoptossomo (TAYLOR et al., 2008).

Os resíduos de FS residem na face interna da membrana plasmática e são rapidamente externalizados para a face externa da membrana em resposta a aumentos de Ca^2 intracelular, injuria celular ou agente indutor de MCP (MARTIN et al.,1995).

Um método muito utilizado na detecção da MCP é a utilização na detecção da MCP é a utilização da Anexina V, uma proteína que se liga eficientemente a FS externalizada de maneira reversível e dependente de Ca^2, combinada com moleculas fluorescentes (MARTIN et al., 1995; BRUMATI et al., 2008). O processo de MCP pode ser pela via extrínseca, mediantes estímulos externos que ativam receptores

específicos na superfície celulares chamados receptores de morte (PAROLIN; REASON, 2001), ou pela via intrínseca, em função de estímulos internos de estresse intracelular como perturbações do ciclo celular e vias metabólicas, estes estímulos promovem um desbalanço das proteínas reguladoras da MCP existentes no citosol, as proteínas pró- e anti-apoptoticas da família do Bcl-2 irão interagir entre si e promoverão a liberação de proteínas mitocondriais em especial o citromo C, que interage no citoplasma com o fator apoptótico ativador de protease-1, pro-Caspase-9 e ATP formando um complexo chamado de apoptossomo que ativa a Caspase-3 (caspase efetora) que executa a MCP da célula (THORBUN, 2004). Proteínas do citoesqueleto como a Gelsolina e a PAK2 (p21 (CDKN1A) activade Kinase 2) também são clivadas pela Caspase-3, produzindo alterações celulares típicas da apoptose, como a formação de “blebbing” e corpos apoptoticos (CHANG; YANG, 2000).

A angiogênese é o processo de formação e crescimento de novos vasos sanguíneos, que tem como consequência a neovascularização. A indução da angiogênese constitui um fator importante na carcinogênese. Portanto, para que o tumor prolifere é necessário que ocorra angiogênese local. A neoangiogênese ocorre na transição do processo hiperplásico para neoplasia, portanto antes da formação tumoral propriamente dita (CALUX et al., 2001; GRAÇA et al., 2004).

3.6 MÉTODO DA CITOMETRIA DE FLUXO E CICLO CELULAR

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para a contagem, exame e classificação das microscópicas partículas suspensas em meio liquido em fluxo. Esta técnica permite a analise de vários parâmetros simultaneamente através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico que pode analisar as características físicas e químicas da célula (SAELENS et al., 2004).

O processo de morte celular (apoptose) possui um papel essencial na manutenção de homeostase tecidual incluindo o câncer, agindo no controle da proliferação (SAELENS et al., 2004).

A via de morte celular mitocondrial promove eventos apoptóticos que é mediado por vias de morte intrínseca, ou seja, Mitocondrial e extrínseca, ou seja, através de receptores de morte (família dos receptores TNF). A morte celular intrínseca atua com a presença de membros pró-apoptóticos da família Ccl-2, mais precisamente, eventos da subfamília BH3 Bax que leva a oligomerização de eventos do ultimo grupo, seguido da inserção na membrana externa da mitocôndria. Estas moléculas passam a construir canais de saídas de proteínas intermembranadas indo desde a mitocôndria até o citoplasma, incluindo o citocromo C e o fator indutor da apoptose. O citocromo C liberado ativa uma proteína citoplasmática designada de Apaf-1, que recruta e ativa a pró-caspase-9, constituindo um complexo proteico, o apoptossoma. A caspase-9m possuí a função de “caspase Iniciadora”, que recebe e ativa a caspase 3, que é a executora, esta, degradará proteínas importantes para a viabilidade celular (HOWARD; PELC, 1953).

A apoptose pode ser dividida em três fases básicas: Iniciadora, que é altamente dependente do tipo de estimulo apoptótico recebido pela célula por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte como o stress oxidativo ou até erros no DNA. Esta primeira fase pode influenciar a eficácia das fases seguintes. Na fase efetora, ocorre ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases e outros intermediários participantes desta fase. A fase de degradação, a célula adquire características bioquimicase morfológicas que são características deste processo (GREEN; KROEMER, 1998).

As características típicas da apoptose são resultantes de eventos ocorridos na fase de degradação, ou seja, diminuição do volume celular, condensação da crimatina, cariotex e eventuais brotamentos nas membranas, formando os corpos apoptóticos (HAIL et al., 2006; KROEMER et al, 2007). Existem duas vias principais para a regulação apoptótica: 1. apoptose mediado por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de FAZ), presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca; 2. A via de apoptose mediada pela mitocôndria, via intrínseca (HAJRA; LIU, 2004; HAIL et al, 2006).

Ambas as vias possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com finalidade de

executar eventos extracelulares, que resultam na morte celular programada (HAJRA; LIU, 2004; ZHANG et al., 2004). A via extrínseca é iniciada pela associação de monômeros de diferentes receptores de morte na membrana plasmática e, ao se agruparem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (COHEN, 1997; HAIL et al., 2006).

A via mitocondrial envolve alterações na permeabilidade mitocondrial, permitindo o extravasamento do citocromo C, que após associar-se a proteínas adaptadas (APAF-1), culminando na formação do apoptossomo e ativando as caspases 9 e 3, o que desencadeia a morte celular por apoptose. As proteínas Bcl-2 e Vcl-xl, inibem a liberação do citocromo C, enquanto que as proteínas BAD, BID e BAX, induzem a liberação dessa molécula. A via receptor de morte, caracteriza-se pela ativação de receptores de morte (FAZ), os quais uma vez ativados, associam-se a proteínas adaptadoras (FADD), formando o complexo desencadeador de morte DISC que ativa as caspases 8 e 3 e morte celular por apoptose (COHEN, 1997).

A morte programada ativada pelos receptores de morte celular é desencadeada por membros da superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNF), que inclui quase 20 membros receptores de citoquinas, como o TNFR-1 e o Faz. Estas proteínas recrutam proteínas adaptadoras, incluindo FADD, com domínios de morte citosólicos vinculado as pró-caspases 3, 7 é particularmente a caspase 8 (COHEN, 1997).

O conceito de ciclo celular foi introduzido em 1953 tendo auxilio no deliamente de diversos eventos de proliferação celular de mamíferos. Durante o ciclo celular podem ser distintas as populações celulares nas seguintes fases: Fase G1 (Gap 1), é o intervalo após a mitose durante o qual as células se separam para iniciar a síntese de DNA. Este período é caracterizado pela transcrição genica e tradução, levando a síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA; Fase S, período no qual ocorre a duplicação do DNA celular e o G2/M (Gap 2) intervalo após a síntese de DNA durante o qual as células se separam para a divisão e a mitose (SALENS, et al., 2004).

O ciclo celular é um processo através do qual uma célula somática duplica seu material genético e o reparte igualmente a duas células filhas. Este processo é didaticamente dividido em duas fases principais e interfase e a mitose. Na interfase ocorre a duplicação do DNA e a preparação para a fase seguinte. Na mitose ocorre a

divisão celular, ou seja, a finalidade maior do ciclo celular. A mitose apesar de ocupar uma pequena parte do ciclo, é crucial para o crescimento e diferenciação do organismo, onde também participa do processo de renovação celular (HOWARD; PELC, 1986).

Para a inicialização do ciclo celular, uma sequencia ordenada de eventos precisa ocorre, determinando o processo de divisão: Ligação de um fator de crescimento a um receptor especifica na membrana plasmática; Ativação deste receptor através de proteínas transmembrana, que ativam as proteínas transdutoras de sinais presentes no citoplasma através do domínio interno do receptor; Transmissão do sinal, por estas proteínas transdutoras, até o núcleo; ativação de proteínas regulatórias nucleares; iniciação e progressão do ciclo celular (HOWARD; PELC, 1986).

Analises moleculares de células tumorais, revelam que proteínas envolvidas no ponto de checagem G0/G1-S esta inativas na maioria dos casos, e que alterações no ponto de chegarem nos danos do DNA parecem ser responsáveis pela resistência das células tumorais a agentes quimioterápicos ou radiações. Em contraste, alterações no ponto de chegarem G2/M são encontradas mais raramente. Algumas alterações no complexo mecanismo regulatório de transição G0/G1-S, maior alvo de alterações em câncer, envolvem deleção ou super expressão de genes ou mutações pontuais que impossibilitam a função genica, com resultado comum de alteração do balanço de fosforilação/desfosforilação, determinando o estado proliferativo da célula (STEBEL et al., 2000).

O controle da proliferação celular ocorre na fase G1, e na parada do crescimento de células pode ser concluída nesta fase, pela depleção de fatores de crescimento ou em condições de cultura sob alta densidade celular. O estado de parada de crescimento reversível (G0), é um processo ativo que envolve a expressão e atividade de produtos de genes de parada de crescimento. Sob estas condições, um programa intrínseco de expressão genica é induzido e genes envolvidos na parada de crescimento começam a ser altamente expressivo (STEBEL et al., 2000).

O Iodeto de Propidio (PI) é um fluorocromo que se intercala estequiométricamente às duplas fitas de DNA na célula. Células diploides que não estejam replicando (Fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de células 2n, emitindo sinais de menor intensidade que as células situadas na fase S, durante a qual

ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de menor intensidade que aquelas situadas em G2/M até que completem a replicação do conteúdo de DNA para 4n, que permanece assim durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula mãe se origina em duas células filhas. As células situadas no pico hipodiplóide (Sub-G1), possuem conteúdo de DNA fragmentado, característico de eventos da morte celular. Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção dos gráficos de distribuição das células no ciclo celular. Considerando a existência de uma relação proporcional entre o aumento do conteúdo de DNA e a área do pulso gerado (STEBEL et al., 2000).

As atividades dos complexos ciclina-CDK são reguladas por fatores chamados de inibidores de CDK-S. Existem duas classes principais de inibidores, famílias Cip/Kip e Ink-4/ARF. Dentro da falilia Clip/Kip destacam-se o P21, P27 e P53. Inibidores estes que funcionam como supressores do tumor e estão frequentemente alterados em tumores. A atividade transcricional de P21 esta sob o controle da proteína P53. A proteína P21 também compete com a ciclina D com a mesma intenção de provocar a parada do ciclo celular. A P27 responde aos seus supressores de crescimento e compete com o complexo E7CDK-2, também provocando uma parada do ciclo celular no ponto de restrição G1/S (SHWABE et al., 2003).

Os membros da família Bcl-2 regulam a apoptose. Esta família inclui membros pró-apoptóticos (Bax e Bad) e anti-apoptótico (Bcl-2) possui cerca de vinte proteínas já identificadas, cada uma delas com duas ou mais isoformas. Dentre essas proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Vl-W, mcl-1 tem função antiapoptótica. Na mitocôndria, durante a apoptose, algumas modificações dessas proteínas podem ocorrer (ZHANG et al., 2004).

3.7 TAMANHO E GRANULOSIDADE CELULAR

Os eventos celulares registrados pelo aparelho são apresentados como hitogramas e citogramas.

O citograma representa características de tamanho celular relativo (FSC: Fowrd Scatter Chanel) no eixo “X” e de granulosidade/complexidade relativas (SSC: Side Scatter Chanel) no eixo “Y” das células avaliadas. Partindo da avaliação do citograma, foram identificadas duas diferentes populações, nomeadas como Gate 1 e Gate 2 (R1 e R2), R1 com tamanho e granulosidade/complexidade menor que as células encontradas no R2.

O histograma registra as emissões ou intensidade de fluorescência do evento ou estimulo avaliado na população celular selecionada nos *gates*. O programa Cell Quest Pro® inserido em um computador Macintosh do Citometro resumiu por estatística descritiva, a intensidade de fluorescência originada por cada população quando foi ou não estimulada.

3.8 MÉTODO COLORIMÉTRICO – MTT

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parametros empregados como o MTT. O MTT é um sal amarelo solúvel metabolizado pelo succionato desidrogenase que é presente na mitocôndria, transformando-se em um produto azul solúvel. O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade e.mobilidade da célula ou da perda da permeabilidade da membrana inibe a incorporação destes corantes (HARBELL et al., 1997).

A interação entre células e biomateriais por meio do teste de MTT, sendo esta técnica uma vantagem, pois esta técnica possui a capacidade de identificar a alteração no metabolismo e não função celular decorrente do contato entre as células e os materiais mesmo na ausência de morte celular (CIAPETTI et al., 1996).

Existe outra técnica para elevada quantificação das amostras utilizadas. Nesta técnica, as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectofotometria. Esta técnica é rápida e

quantitativa, pois permite avaliar varias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50% de morte celular. Desde então, vários estudos comparando o uso do vermelho neutro com o MTT (BABICH; BABICH, 1979; BORENFREUD; PUERNER, 1985; HOCKLEY; BAXTER, 1986; BORENFREUD et al., 1988; BABICH; BORENFREUD, 1992; TSUTSUI et al., 1994; OLIVIER et al., 1995).

Experimentos demonstram que ao usar simultaneamente o vermelho neutro, MTT e o cristal violeta para a analise de crescimento celular e de viabilidade, o método pode ser útil na avaliação da citotoxicidade de substancias mediadas por diferentes mecanismos, levando a diferentes respostas e ainda, o uso de vários tipos de avaliacao evitam resultados duvidosos. Estudos comparando simultaneamente a viabilidade e o crescimento celular utilizando os corantes vermelho neutro e o *amino black* respectivamente, mostraram boa correlacao com a combinacao dos dois métodos no mesmo ensaio, resultando em informacoes tanto sobre a viabilidade como sobre o numero e células (CIAPETTI et al., 1996).

3.9 RODAMINA 123

A Rodamina, 123 pode ser utilizada para a visualização de mitocôndrias (HALLAP, 2005). Ela é captada através da energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial que é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico trans-membrana ($\Delta\Psi$) negativo dentro de cerca de 180-200 mV, e de um gradiente de próton de uma unidade. Esta energia é capaz de conduzir a síntese de ATP para ser utilizada como combustível nos processos celulares. Cátios lipofílicos membrana permeável, denominados de sondas, acumulam-se em células vivas, organelas e lipossomos exibindo um potencial de membrana negativo e vem sendo utilizados para decifrar o mecanismo de regulação e controle da transdução energética. Estas sondas incluem aquelas que apresentam atividade óptica e fluorescente após acumulação em sistemas energizados, sondas

radio-coradas e sondas não coradas utilizadas com elétrons específicos (COSSARIZZA, 2007).

3.10 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos são resultantes de oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mediados por ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL). A reação destas espécies com os AGPI presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como indicador do stress oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001; ANTUNES et al., 2008).

A LPO consiste em uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos RL sob os lipídios insaturados das membranas celulares, levando a destruição de sua estrutura, falência dos organismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, a morte celular. Os RL (Moléculas que contém um ou mais elétrons pareados) e as ERO pode contribuir para o aparecimento de doenças ou estarem presentes em situações de toxicidade. O câncer, as doenças inflamatórias ou neurodegenerativas como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer, o envelhecimento, o alcoolismo, e a deficiência de Vitamina E, assim como de outros minerais, são alguns exemplos de situações onde pode existir o envelhecimento de RL (JORDAO et al., 1998; LEE et al., 2000).

A LPO constitui o evento citotóxico primário que desencadeia uma sequencia de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substancias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e, ou saída de nutrientes e substancias tóxicas e a célula, alterações do DNA, oxidação da Lipoproteína de baixa intensidade (LDL) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, colágenos e elastina (LIMA; ABDALLA, 2001).

Todos os componentes celulares são suscetíveis a ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos e sofre mais alterações na sua estrutura e permeabilidade pela LPO. Essa decomposição de peróxidos lipídicos produz ampla variedade de produtos finais, um dos quais é o malonaldeido (MDA – $C_3H_{14}O_2$), que possui atividade genotóxica e citotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao stress oxidativo, portanto é considerado um marcador confiável de LPO (TURGUTA et al., 2006; ANTUNES et al., 2008). A GSH é um tripeptideo, que contém cisteina e o tiól não proteico é mais abundante nas células dos mamíferos. Concentrações baixas de GSH tem sido encontradas em algumas doenças, como Alzheimer e AIDS e estão associadas ao maior risco de stress oxidativo e a ocorrência de infecções oportunistas. Portanto, a GSH atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese proteica, e esta também pode ser perdida de modo irreversível em situações de stress oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidativa e não sendo novamente reduzida (JORDAO et al., 1998; WU et al., 2004).

Alguns autores consideram a GSH mais do que um antioxidante, propondo que pode exercer funções do tipo neuromodulador e/ou neurotransmissor. Seus estudos confirmam que a depleção da GSH contribui para a o aparecimento de stress oxidativo, representando uma causa primária de neurodegeneração e apoptose, devida a alterações nas funções redox da mitocôndria. A depleção do GSH e as modificações posteriores das proteínas devidas a glutationilação não são apenas um subproduto do stress oxidativo produzido durante a morte celular, mas constituem reguladores críticos do processo apoptótico (NICOLE et al., 1998; FRANCO; WU et al., 2004; CIDIOWSKI, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram obtidas dez (20) nadadeiras de tubarão azul adulto proveniente da empresa KODEN Indústria e Comercio de Importação e Exportação Ltda., Santos-SP. Aprovado pelo Comite de Etica protocolado sob nº2384.

Amostras das nadadeiras foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10% para análise de microscopia de luz. As mesmas regiões também foram colhidas em nitrogênio líquido para análise em citômetro de fluxo.

4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Foram mensuradas medidas clássicas para as nadadeiras de tubarões segundo (COMPAGNO, 1984 e 2003). As medidas foram mensuradas com o auxilio de uma fita métrica sendo mensurada a margem anterior, base, altura e base mais a ponta livre das nadadeiras.

4.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

As amostras para microscopia foi armazenado em formol tamponado 10%.

4.2.1 Fixação e processamento das amostras para microscopia de luz (paraplast embedding media – paraplast plus, Oxford lab., USA)

As nadadeiras coletadas foram recortadas em cubos com lados medindo aproximadamente 0,5cm e colocados em solução fixadora de formalina tamponada a 10%, permanecendo por 24-48 horas para completa fixação. Em seguida o material foi desidratado em série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em paraplast Os cortes sob laminas foram corados com HE e picrossirius. Fotodocumentados no microscópio OLYMPUS modelo BX60 e a câmera modelo AxioCam HCr, marca ZEISS. A fotomicrografia foi feita através do programa KS400, 3.4 da marca ZEISS, ano 2000.

4.3 COMPOSTOS DA CARTILAGEM

O composto da nadadeira do Tubarão Azul foi preparado no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantã. Esse composto foi preparado de uma nadadeira inteira descarnada e previamente congelada a -4°C.

Foram cortados com o auxilio de um bisturi numero 5 os raios e os elementos radiais e a ponta livre da nadadeira, seguindo as linhas que os separam.

Os fragmentos foram envolvidos em papel manteiga e mergulhado em nitrogênio liquido para um congelamento rápido. Em seguida foi macerado com o auxilio de um martelo comum de 20 cm de comprimento.

Logo após o “pó” de nadadeira foi colocado em um Becker acondicionado em um recipiente com gelo, onde foi adicionado 3 ml de PBS (Perbolato de Sódio) e homogeneizado com um auxilio de uma espátula.

O composto foi filtrado com o auxilio de um filtro de 22 µm, alíquotado e congelado em um freezer a -4°C.

4.4 ANALISE DA QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DO COMPOSTO DA CARTILAGEM PELO MÉTODO BRADFORD

O composto das nadadeiras de tubarão foi descongelado diluído em concentrações de 100%; 50%; 25%; 10% e 5%) e desta concentração foi colocado 20 ul em 5 (cinco) poços da placa de Wells. Adicionado; 10ul; 50ul; 100ul; 150ul; 300ul de BSA e 230 ul do BRADFORD em cada poço. Numa outra fileira foi distribuído (1000; 990; 950; 900; 850; 800; 750 e 700) de H_20 destilada e adicionado o BSA para igualar a quantidade em (ml) em todos os poços permite a analise da curva da calibração da albumina. A análise da curva de calibração da albumina e proteína total foi realizado em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT COMPOSTO DA CARTILAGEM

O composto das nadadeiras de tubarão foi separado em diluições seriadas (100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39% e 0,19%) e testada em Tumor de mama murina, Fobrobrastos e Tumor de mama de cão para analisar a viabilidade celular das células pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazolim brometo]. Este método é baseado na redução do MTT a cristais de formazan pelas células vivas. Foram adicionados 10 mL de MTT (5 mg/mL) e 90 mL de meio RPMI 1640 completo às células e estas incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de C02 a 37°C. Após este período, o meio foi removido. Acrescenta-se 100 ml de metanol para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540nm. Através deste ensaio colorimétrico foi avaliada a citotoxicidade do composto em linhagens tumorais de melanoma B16F10, e a determinação matemática pela equação da reta para a definição da concentração inibitória (IC50%).

4.6 DETERMINAÇÃO FASES DO CICLO CELULAR VIAS DE MORTE CELULAR E ATIVIDADE CELULAR DA NADADEIRA DO TUBARÃO

Para obtenção das células das nadadeiras de tubarão os fragmentos armazenados em nitrogênio líquido foram descongelados e realizados a digestão dos tecidos pela colagenase. Estas células foram separadas em tampão citrato pH 7,6, processadas de acordo com a técnica descrita por Vindelov e filtradas em redes de 30 µm (Spectra Mesh Nylon Filters) para separar as células do estroma e dos debris celulares. Rapidamente as células foram incubadas com 30 mg/mL de tripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por 10 min a temperatura ambiente. Inibidor de tripsina 5 mg/mL de tripsina (Sigma Chemical Co) e 0,1 mg/mL de ribonuclease A (Sigma Chemical Co.) adicionados por 10 minutos para uma ótima resolução do DNA. Finalmente serão adicionados 415 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma Chemical Co.) por 15 min antes da análise no citômetro e 5 µl de solução Rodamina. Foi avaliada fase do ciclo celular e a morfologia celular pelo programa MODFIT e a Rodamina. Foi calculada pelo programa WINMdi2.9.

4.7 CULTURA CELULAR DOS TUMORES E FIBROBLASTOS

Linhagens de células de tumor mamário de Ernich (TAE) e tumor de mama canino (TMC) e células de fibroblasto humano (FN1) foram adquiridos do banco de célula do Laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan. O Tumor de mama de cão, foi doado pelo laboratório de células troncos do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Passaram pelo processo de descongelamento rápido em banho-maria 37°C e foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm^2 em RPMI, suplementado com 10% de soro fetal de bovino (VITROCELL), 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO) 1% de ácido

pirúvico (GIBCO), pH 7.4, em estufa a 37 º com CO_2 a 5% umidificada. Após 72 horas de aderência e de confluência, as células foram tripsinizada centrifugadas e ressuspendida em solução fisiológica para serem aplicadas nos animais experimentais. Para contagem e avaliação de viabilidade celular foi utilizado o corante azul de Tripan e câmara de Neubauer.

4.8 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DO CULTIVO CELULAR TRATADA COM COMPOSTO DA NADADEIRA DO TUBARÃO

As células em cultivo foram tripsinizadas, centrifugadas durante 10 minutos à 1200 rpm, o sobrenadante foi descartado, e as células ressuspendidas em tampão (Facs Flow – BD) para a citometria. As células foram centrifugadas novamente durante 3 minutos à 1200 rpm e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 1 ml de etanol 70% RNAse, transferidas para microtubulos e armazenadas à uma temperatura de -20% C.

As amostras fixadas e armazenadas previamente foram centrifugadas à 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 1 ml de tampão de citometria e novamente centrifugado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em solução de PI, preparada a partir de 5 mL de PBS (tampão fosfato de sódio pH=7,4), ao qual foram adicionados 50 μL de RNAse (2 mg/mL) e 20 μL de Iodeto de propidio (5mg/mL). Em seguida realizou-se a aquisição dos dados em Citometro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos, e para análise foi utilizado o programa Win Mdi 2.8

4.9 DETERMINACAO *IN VITRO* DE PRODUTOS DE RADICAIS PEROXIDADOS DOS LIPÍDICOS POLIINSATURADOS (LPO) DO TRATAMENTO

Os sobrenadantes das culturas celulares utilizados após confluência em média de 80% para a metodologia do MTT, foram recolhidos antes do teste de citotoxicidade MTT e congeladas imediatamente a -20º C até o momento da analise da peroxidação lipídica.

A quantificação da peroxidação de lipídeos em culturas celulares é baseada na formação de substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), predominantemente o malondialdeido (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substancias produzem uma coloração característica que é medida através da espectrofotometria.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Em microtubo foi adicionado 50 µL da amostra com 250µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Em outro microtubo, foi adicionada 50µL da mesma amostra juntamente com 250µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,86%. Os microtubulos foram colocados em “banho-maria” (100º C) por 20 minutos, seguido de resfriamento à 0°C por 20 minutos. Os microtubulos foram centrifugados à 8000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificacao das TBARS. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onde de 535 nm.

O cálculo da medida de lipoperoxidacao foi realizado descontando o valor do branco respectivo de cada série, subtraindo a absorbancia da séria de TBA da média da séria de TBA e dividindo-se pelo coeficiente molar do MDA. Os resultados foram expressos em nmoles de MDA por mililitro.

4.10 ANALISE ESTATÍSTICA

As analises estatísticas foram realizadas pelo método de variância ANOVA seguido de testes comparativo múltiplo de TUKEY-KRAMER. Os valores foram expressos em média e desvio padrão, considerando-se como valore significantes $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados abaixo se referem às metodologias utilizadas para a realização deste estudo

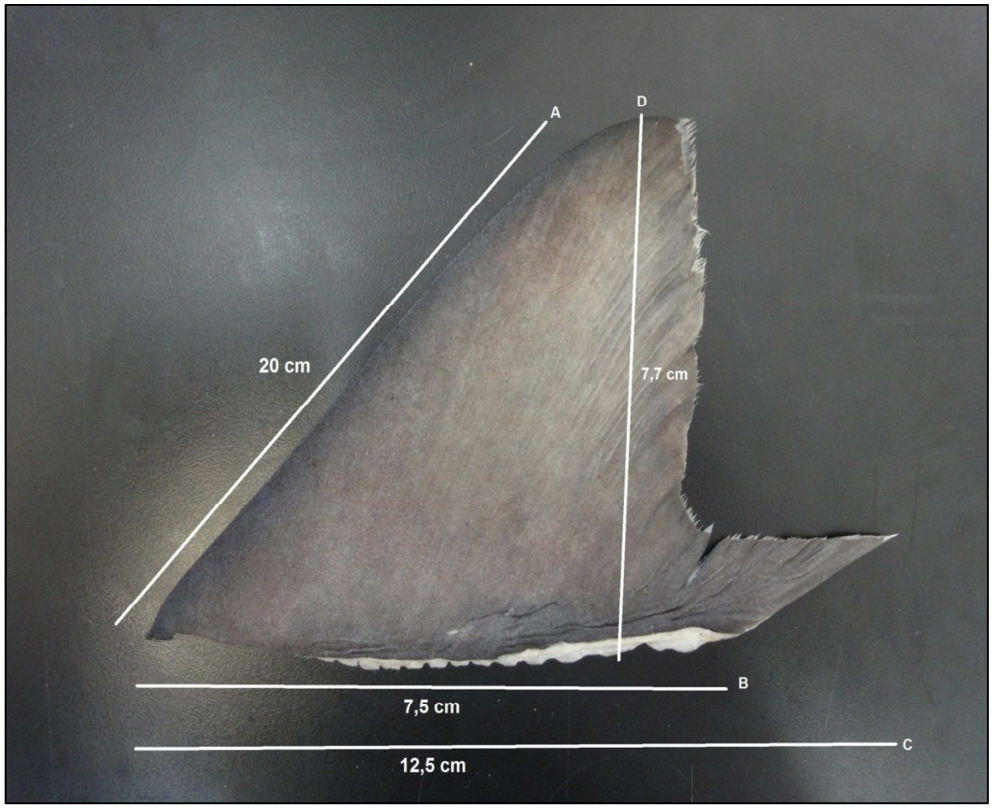
5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Foram avaliados a morfometria e anatomia da nadadeira de tubarão

5.1.1 Morfometria

As nadadeiras dorsais foram mensuradas e observou que nas nadadeiras integras (semiúmidas) a margem anterior, medida desde a origem até o ápice, teve em média 20 cm de comprimento (Figura 1A), a base da nadadeira, medida desde a origem até a intersecção, teve em média 7,5 cm de comprimento (Figura 1B), a medida desde a origem até a ponta livre da nadadeira dorsal teve em média, 12,5 cm de comprimento (Figura 1C), e a altura da nadadeira, desde a base até a ponta do ápice em linha reta teve em média 7,7 cm de comprimento (Figura 1D).

Figura 1 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida do Tubarão azul (*Prionace glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2011.

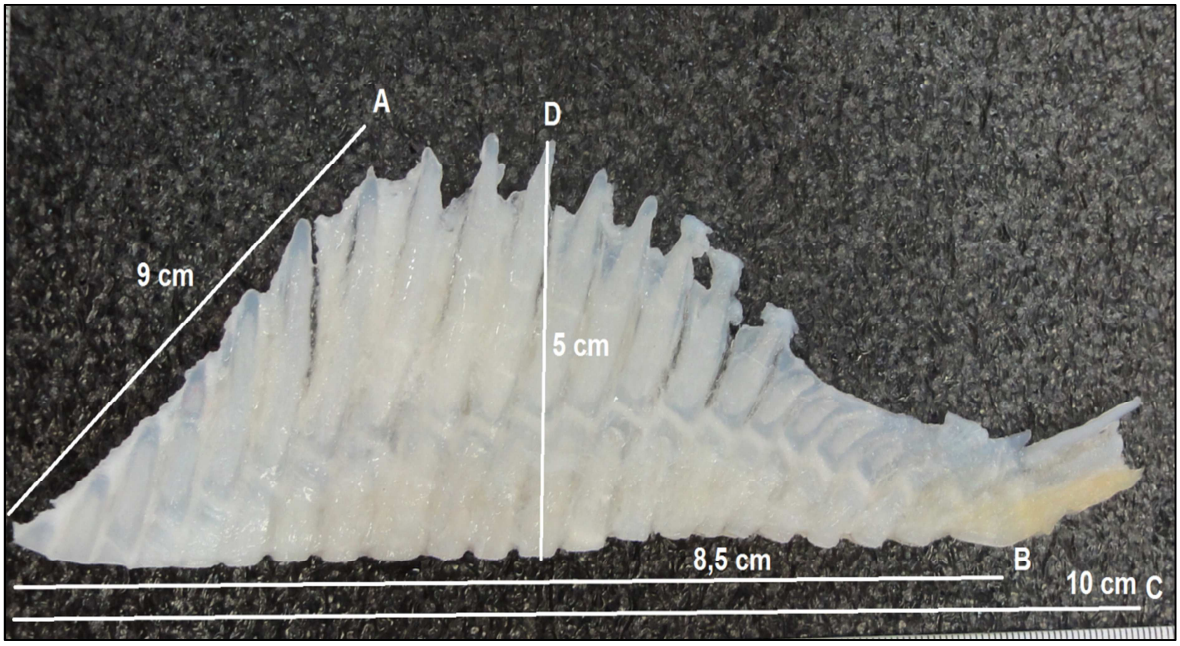
Legenda: A: margem anterior; B: Comprimento da base; C: Comprimento total; D: Altura.

A nadadeira descarnada, a margem anterior, medida desde a origem até o ápice, teve em média 9 cm de comprimento (Figura 2A), a base da nadadeira, medida desde a origem até a intersecção, teve em média 8,5 cm de comprimento (Figura 2B), a medida desde a origem até a ponta livre da nadadeira dorsal teve em média, 10 cm de comprimento (Figura 2C), e a altura da nadadeira, desde a base até a ponta do ápice em linha reta teve em média 4,5 cm de comprimento (Figura 2D).

Os elementos radiais foram maiores quando contados a partir do segundo raio ao décimo segundo, sendo menor com pouco menos de 1 cm quando servido como base para o segundo raio dérmico, contado da origem a ponta livre da nadadeira. O ponto mais alto dos raios dérmicos, com pouco menos de 2,5 cm ocorrem quando servido de base para o sétimo raio dérmico.

A medida total sem a divisão entre os raios dérmicos e os elementos radiais, foi de 1,5 cm de altura mínima e 5 cm de altura máxima.

Figura 2 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida descarnada do Tubarão azul (*Prionace glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2011.

Legenda: A: Margem anterior; B: Comprimento da base; C: Comprimento total; D: Altura.

5.1.2 Anatomia

A nadadeira integra, apresenta um padrão de forma triangular. A pele é de coloração acinzentada e textura áspera (Figura 3A). Macroscopicamente é visível raios na região superior da nadadeira (Figura 3B), o que demonstra que as nadadeiras possuem finos raios de origem muscular que é encontrado conforme é feito o descarne manual das nadadeiras, porém, não é visto em nadadeiras descarnadas

industrialmente. A nadadeira também possui uma ponta posterior cuja sua base não é totalmente fixa ao corpo do animal.

Figura 3 - Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida íntegra do Tubarão azul (*Prionace glauca*)

Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2011.

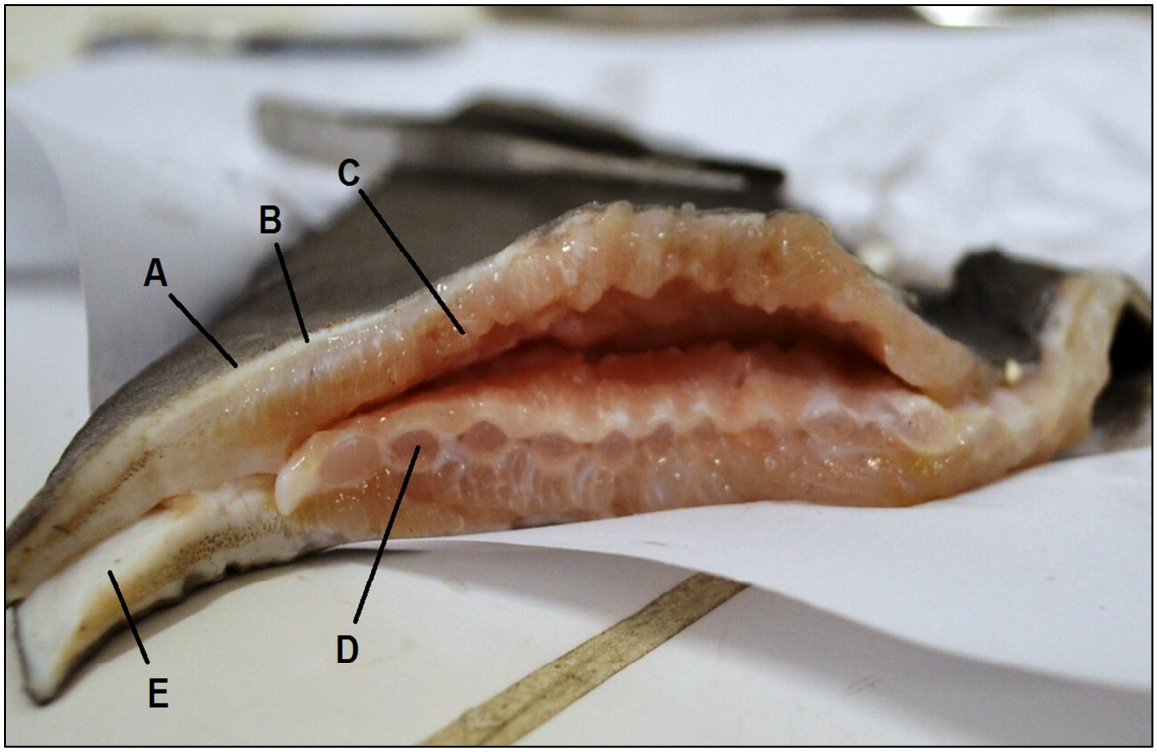
Legenda: A: Epiderme; B: Raios; C: Ponta livre da nadadeira dorsal.

Quando feita a dissecção da nadadeira dorsal a partir de sua base, pode-se visualizar uma fina camada da epiderme (Figura 4A), uma camada mais grossa e branca de derme (Figura 4B). Abaixo da derme encontra-se uma camada grossa de

musculatura (Figura 4C). Entre as camadas de pele e de musculatura, encontram-se os elementos radiais (Figura 4D).

Na região da origem, a nadadeira apresenta uma camada mais clara e espessa, com coloração e consistência semelhante a uma camada grossa de epiderme protegida por uma fina camada de derme (Figura 4E).

Figura 4 - Vista ventral da nadadeira dorsal semiúmida íntegra do Tubarão azul (*Prionace glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2011.

Legenda: A: Epiderme; B: Derme; C: Musculatura; D: Elemento Radial; E: Camada grossa de Epiderme.

Quando vistas as amostras semiúmidas dissecadas a região da margem anterior da nadadeira dorsal é levemente inclinada em direção à margem posterior, formando um ápice no meio da nadadeira. A região superior da nadadeira possui os raios dérmicos (Figura 5A).

Em todas as amostras, foram encontrados aproximadamente 15 raios dérmicos, que estavam interligados através de uma fina membrana interligam os raios dérmicos (Figura 5B).

Logo abaixo dos raios dérmicos, existe uma evidente divisão feita por uma linha que os separam dos elementos radiais (Figura 5C). Esta linha que liga os elementos radiais e os raios dérmicos forma uma leve curva quando vistos da parte anterior a posterior da nadadeira dorsal.

A margem posterior da nadadeira dorsal apresenta um leve aclive onde na ponta se forma um pedúnculo, a ponta livre da nadadeira dorsal, que não possui ligação à coluna do animal (Figura 5 D).

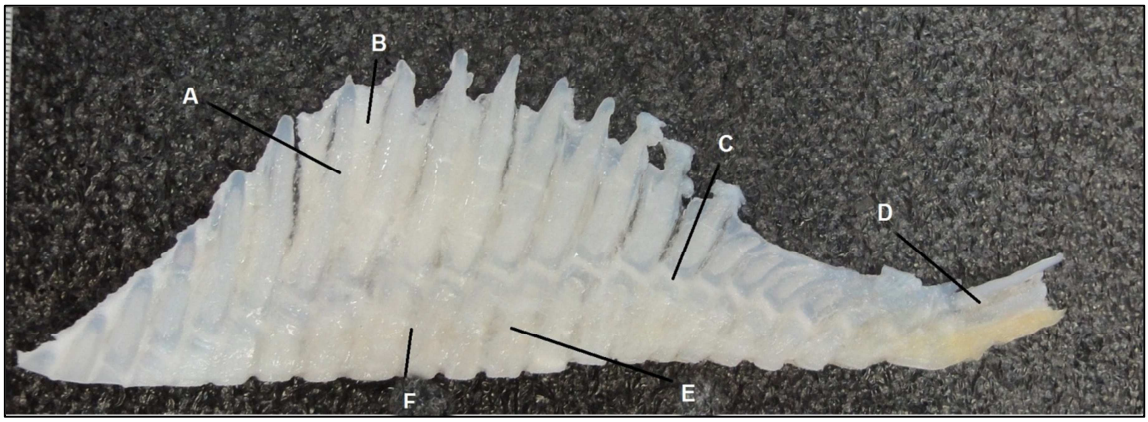
Os elementos radiais (Figura 5 E) estão dispostos abaixo dos raios dérmicos, servindo assim de base para os mesmos, sendo sua própria base os elementos dérmicos basais.

Assim como os raios dérmicos, os elementos radiais possuem uma fina membrana onde se ligam entre si e ligam-se aos raios dérmicos (Figura 5F).

Os raios dérmicos são menores quando contados da origem da nadadeira em direção ao ápice, sendo o primeiro raio dérmico o menor, medindo em média 1,5 e o décimo quarto raio dérmico o maior medindo em média 3 cm. Após o ápice o tamanho decai, voltando a aumentar na ponta livre da nadadeira.

Os elementos radiais estavam ausentes no inicio das nadadeiras, aparecendo somente abaixo do segundo raio dérmico ao décimo segundo raio dérmico, sendo ausentes abaixo dos três últimos raios, onde faz parte o conjunto de raios dérmicos da ponta livre da nadadeira dorsal.

Figura 5 – Vista lateral da nadadeira dorsal semiúmida descarnada do Tubarão azul (*Prionace glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2011

Legenda A: Ponta livre da nadadeira; B: Raios Dérmicos; C: Elemento Radial; D: Membrana que interliga os raios dérmicos; E: Divisão entre o elemento radial e o raio dérmico; F: Membrana que interliga os elementos radiais.

5. 2 MICROSCOPIA DE LUZ

A histologia da nadadeira de tubarão-azul é constituída de cartilagem tipo hialina, revestida por uma camada de pericôndrio que é revestida de uma túnica de tecido conjuntivo denso e não modelado.

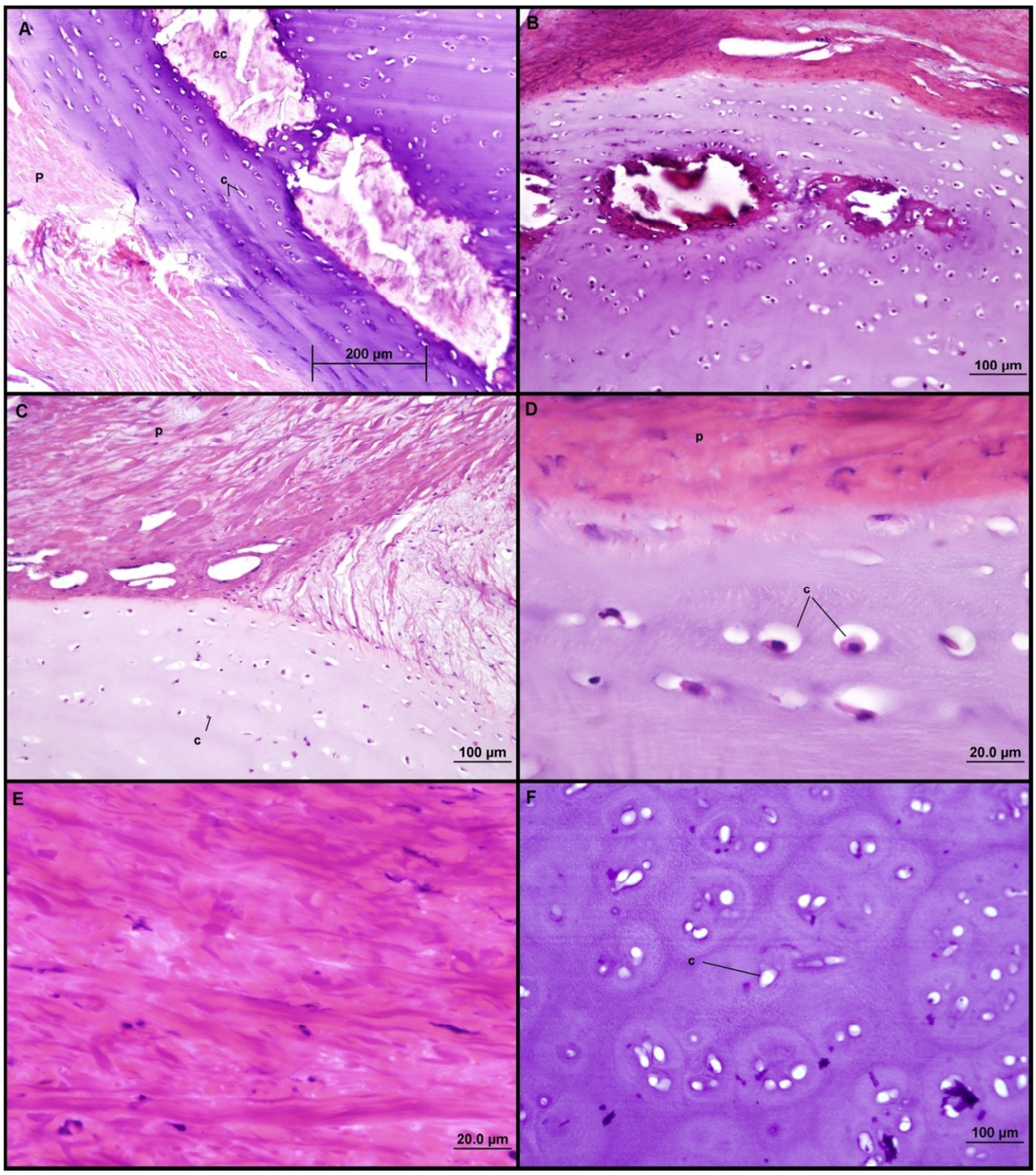
Os cortes longitudinais dos elementos radiais na porção interna se observaram a presença de condrócitos, matriz cartilaginosa, regiões circulares com acúmulos de cartilagem calcificada e na região mais externa o pericôndrio.

Nos cortes transversais os acúmulos de cartilagem calcificada aparecem como túbulos dispostos na periferia.

A avaliação dos raios dérmicos procedeu-se, por serem mais longos, em duas etapas, sendo a primeira proximal ao elemento radial e a segunda longitudinal ao elemento radial. Na região proximal ao elemento radial, pode-se observar uma conformação bastante complexa de um semi-anel de cartilagem envolvendo uma massa centro-posterior fibrosa. Na região periférica o mesmo pericôndrio encontrado no

elemento radial se envolve a totalidade da cartilagem. As porções tubulares de cartilagem calcificada são encontradas apenas na porção distal do raio dérmico, apresentando as mesmas características do elemento radial (Figura 6 A, B, C, D, E, F).

Figura 6 - Fotomicroscopia da cartilagem da nadadeira do Tubarão-azul (*Prionace glauca*), utilizando a técnica de Hematoxilina Eosina (HE)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2012.

Legenda: A: Pericondrio, Cartilagem Calcificada e Condrócito; B: Pericondrio, Cartilagem Calcificada (cc) e Condrócito (c); C: Dois tipos de pericôndrio e condrócitos; D:Pericondrio e condrócito; E: Pericôndrio F: Condrócitos

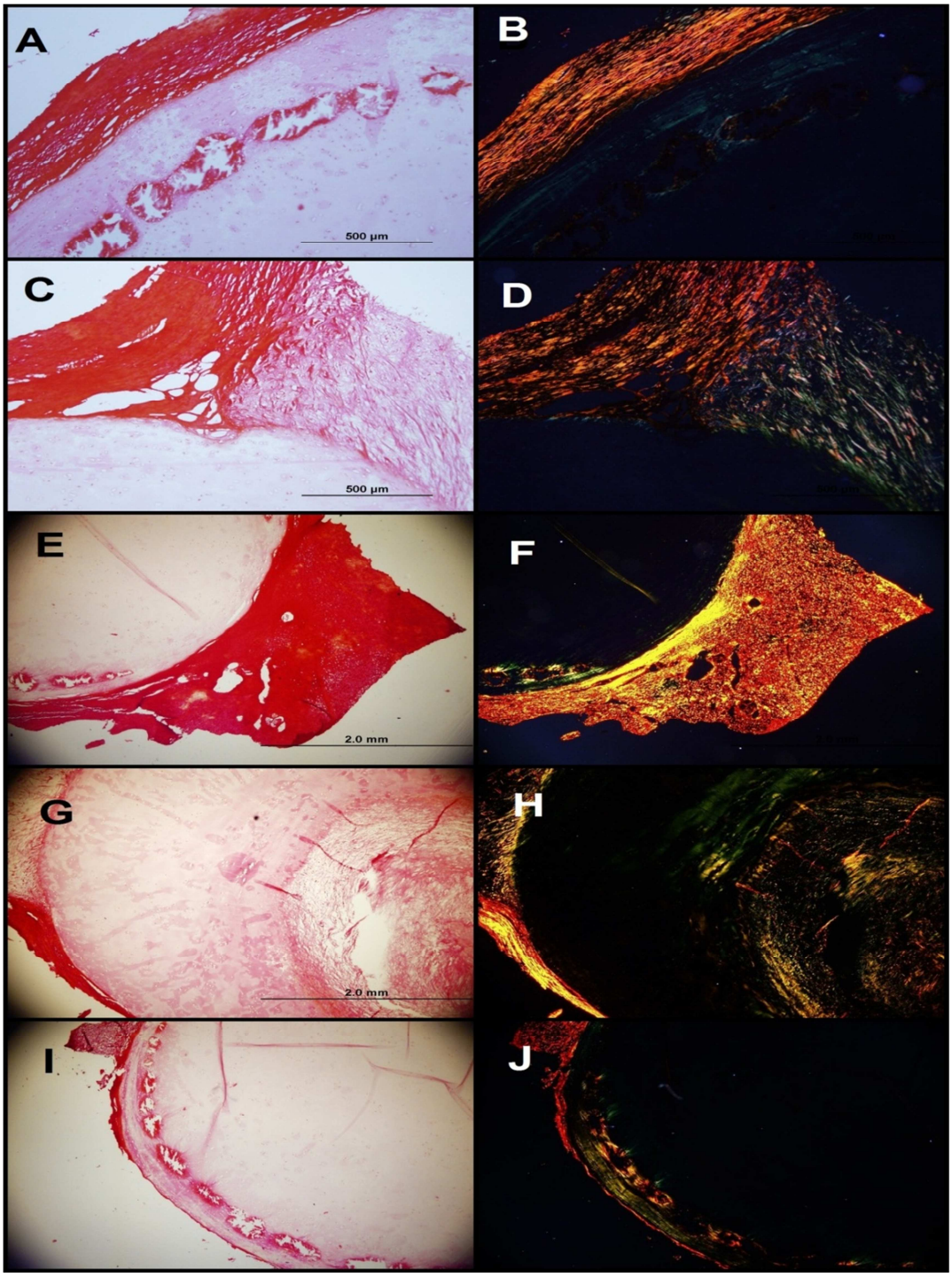
Com a coloração de picrossirius red observou-se as fibras colágenas do tipo I (coloração vermelho-brilhante), com fibras compactas entre si e paralelas ao comprimento do corpo no entorno da cartilagem hialina.

O pericôndrio é constituído de colágeno que reveste a cartilagem hialina das nadadeiras. Quando visto pela técnica de Picrossirio red, foi possível identificar que a zona que liga os elementos radiais que são compostos por uma região rica em fibra imatura de colágeno de tipo II (Coloração amarela), que apresentam fibras mais finas, difusas e dispostas quase que perpendicularmente as fibras de colágeno do tipo I.(Figura 7B).

Pode-se observar também que na região mais central da cartilagem foi encontrada uma região que apresentava uma região com colágeno de tipo III (Figura 7H).

O pericôndrio da cartilagem é fibrosa e composta de fibras de colágeno do tipo II e do colágeno de tipo I (Coloração vermelha) paralelas a este (Figura 7D). Sendo que a região externa (periferia) que ligam os raios dérmicos é formada por colágeno de tipo I (Coloração vermelha),do tipo II (Amarelo-alaranjado) e tipo III (Coloração verde), (Figura 7 F).

Figura 7 - Fotomicrografia da cartilagem da nadadeira dorsal do Tubarão-azul (*Prionace glauca*).



Fonte: SALMON, T., 2012.

Legenda: Elemento Radial visto por picrossirius red (A e C) e sob luz polarizada (B e D); Raios Dérmicos visto por picrossírius red (E, G e I) e sob luz polarizada (F,H e J).

5.3 CITOMETRIA DE FLUXO

O resultado de tamanho, granulosidade, citotoxidade e fase do ciclo celular das células foram obtidos pela Citometria de fluxo.

5.3.1 Tamanho celular e granulosidade das células da cartilagem de tubarão

O tamanho e granulosidade celular foram feitas com as células de cartilagem do elemento radial e com as células de cartilagem do raio dérmico.

5.3.1.1 Elemento Radial

Foram encontradas uma população de 65% de células de menor complexidade e granulosidade (R1) e uma população celular de 35% de células de maior granulosidade e complexidade (R2).

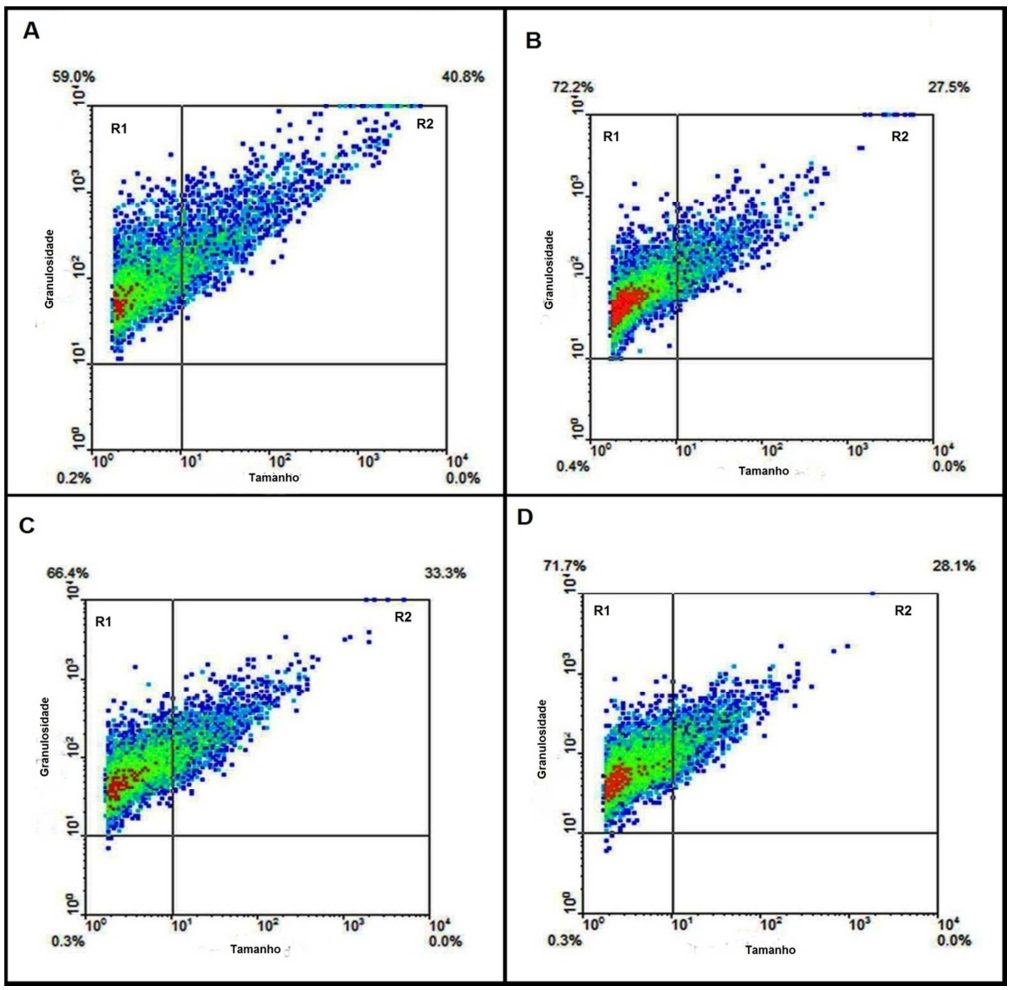
Os gráficos obtidos pela citometria de fluxo da suspensão das celular do Elemento Radial demonstraram células de tamanhos distintos:

A primeira com pequeno volume e pouca granulosidade no citoplasma.

A segunda população, com grande volume e muita granulosidade no citoplasma, como demonstrado no gráfico abaixo.

O histograma abaixo demonstra a concentração de celulares, de tamanho e granulosidade em suspenção do elemento radial.

Figura 8 - Morfologia (tamanho e granulosidade) das células de Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão Azul (*Prionce glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2012.

Legenda: A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3 e D: Amostra 4

5.3.1.2 Raios Dérmicos

Foram encontradas uma população de 68% de células de menor complexidade e granulosidade (R1) e uma população celular de 30% de células de maior granulosidade e complexidade (R2).

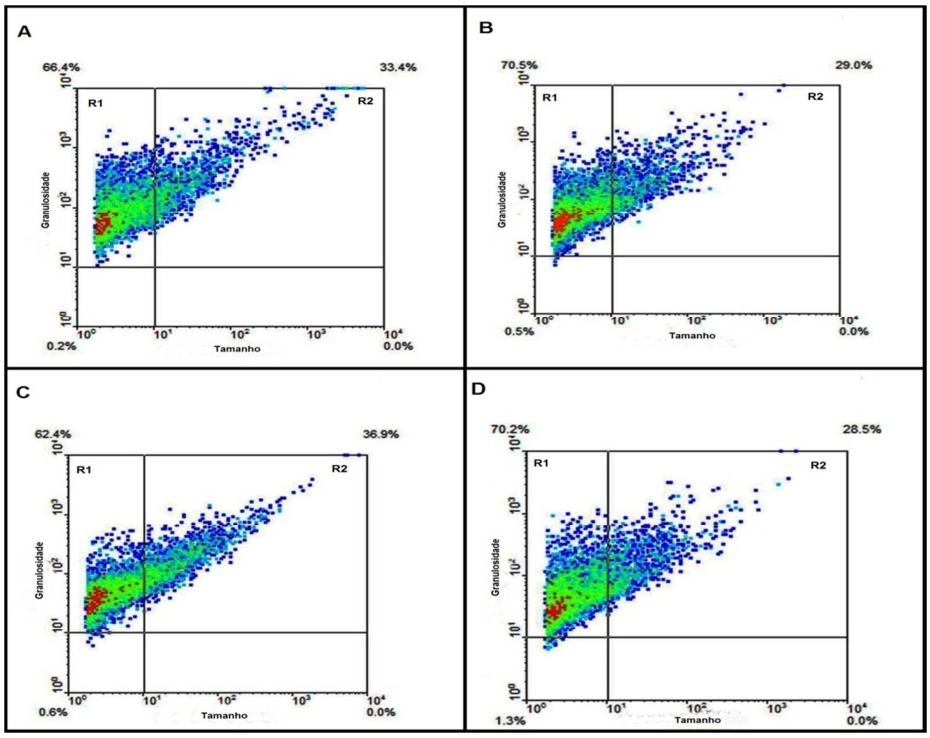
Os gráficos obtidos pela citometria de fluxo da suspensão das celulas do Elemento Radial demonstraram células de tamanhos distintos:

A primeira com pequeno volume e pouca granulosidade no citoplasma.

A segunda população, com grande volume e muita granulosidade no citoplasma, como demonstrado no gráfico abaixo.

O histograma abaixo demonstra a concentração de celulares, de tamanho e granulosidade em suspenção do raio dermico.

Figura 9 - Morfologia (tamanho e granulosidade) das células de Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão Azul (*Prionce glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2012.

Legenda: A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3 e D: Amostra 4.

5.4 POTENCIAL ELÉTRICO E FUNCIONAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL (RODAMINA 123) DA CARTILAGEM DO TUBARÃO

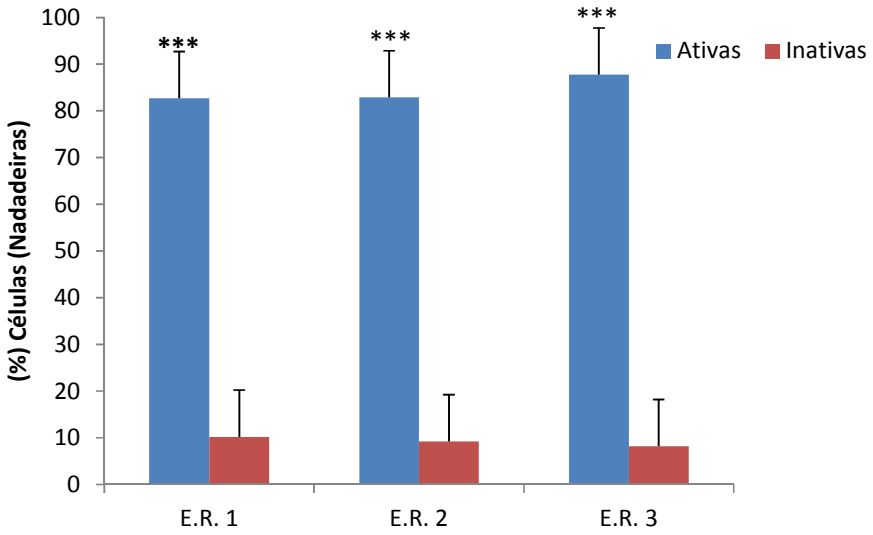
A integridade e o potencial elétrico da membrana mitocondrial foram avaliados pela incorporação da rodamina 123 (Rho-123) em células de cartilagem do elemento radial e do raio dérmico da nadadeira dorsal de tubarão-azul pelo método de citometria de fluxo.

5.4.1 Elemento Radial

O Elemento Radial apresenta uma média de 90% de células ativas e uma média de 10% de células inativas em todas as amostras (Gráfico 1).

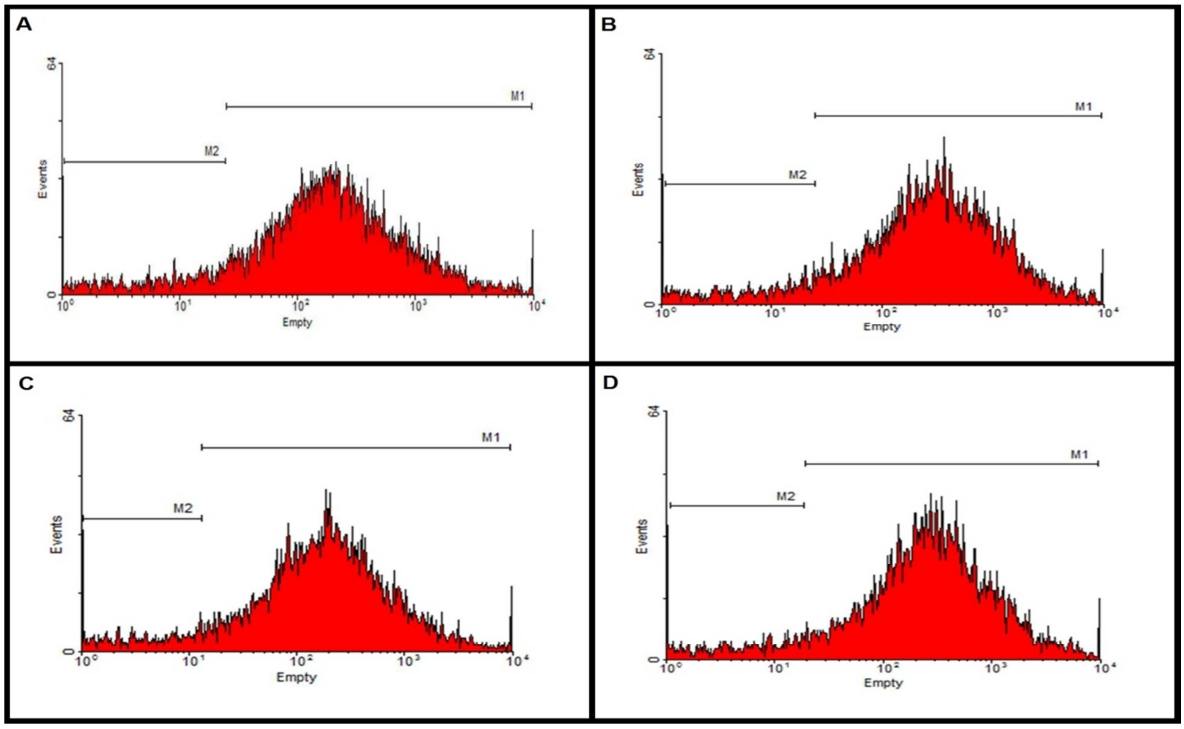
Os histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das quatro amostras obtidas do Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionace glauca*), obtido por Citometria de Fluxo. Onde se pode notar um alto numero de células ativas demostrado pela barra M1 do histograma (Figura 10).

Gráfico 1 - Gráfico de barras das medidas e desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial do Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2012.

Figura 10 - Histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial do Elemento Radial da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionce glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

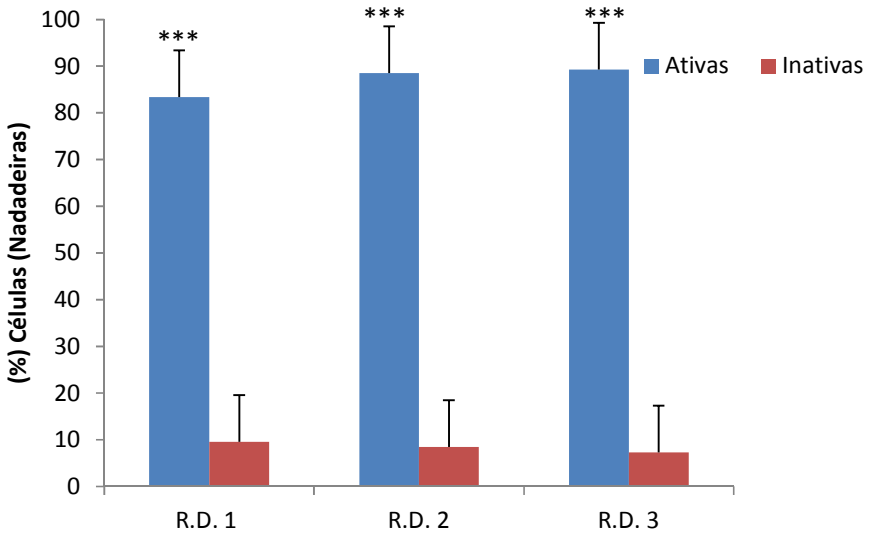
Legenda: A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4.

5.4.2 Raios Dérmicos

O Raio Dérmico apresenta uma média de 95% de células ativas e uma média de 15% de células inativas em todas as amostras (Gráfico 2). Sendo este valor aproximadamente 5% a mais que nos elementos radiais.

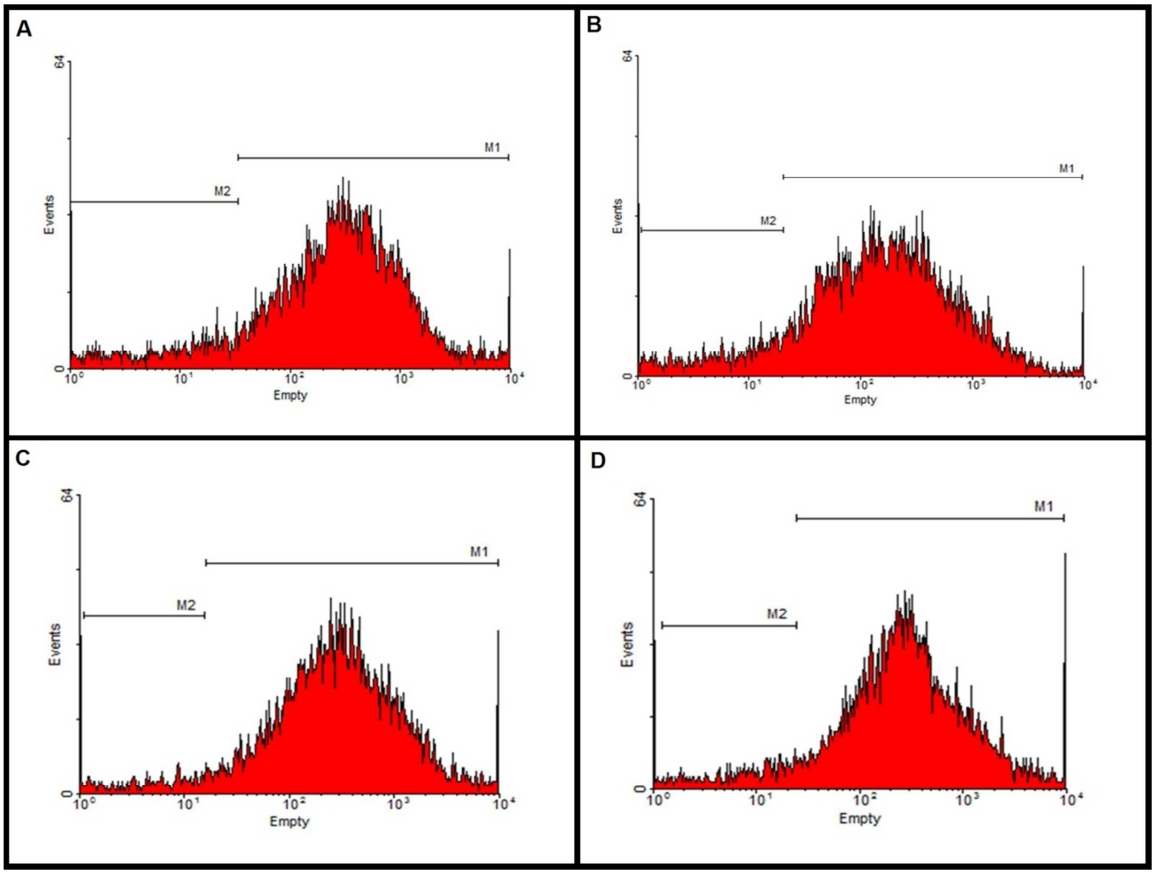
Os Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das quatro amostras obtidas do Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionace glauca*), obtido por Citometria de Fluxo. Onde se pode notar um alto numero de células ativas demostrado pela barra M1 do histograma (Figura 11).

Gráfico 2 - Gráfico de barras das medidas e desvio padrão da atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial do Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Figura 11 - Histograma representativo do potencial elétrico mitocondrial do Raio Dérmico da nadadeira dorsal do Tubarão-Azul (*Prionce glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Legenda: A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4.

5.5 CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DE CARTILAGEM DA NADADEIRA DE TUBARÃO

O delineamento experimental utilizado para a avaliação das fases do ciclo celular foi preconizado pelo método do iodeto de propídeo que se incorpora/intercala as fitas

de DNA. Foram avaliadas separadamente as populações de células cartilagíneas contidas no ciclo celular e as células mortas ou as que apresentaram DNA fragmentado.

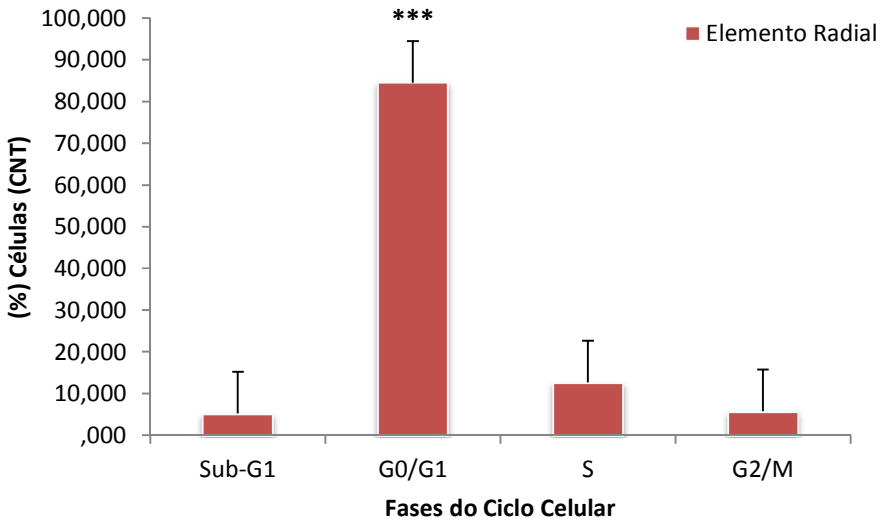
5.5.1 Elemento Radial

O Ciclo celular determinou a porcentagem das células nas fases sub-G1 ou apoptose, G0/G1 onde são encontradas células quiescentes e fase G2/M, onde são encontradas células com capacidade proliferativa.

O Elemento Radial apresentou aproximadamente 5% de células em fase Sub-G1. Já na fase G0/G1 esta porcentagem foi maior, sendo de aproximadamente 85% de células, ou seja, maior quantidade de células quiescentes. Na fase S houve uma diminuição, sendo de aproximadamente 15% de células nesta fase. Na Fase G2/M houve uma queda ainda maior, compreendendo aproximadamente 6% das células nesta fase (Gráfico 3).

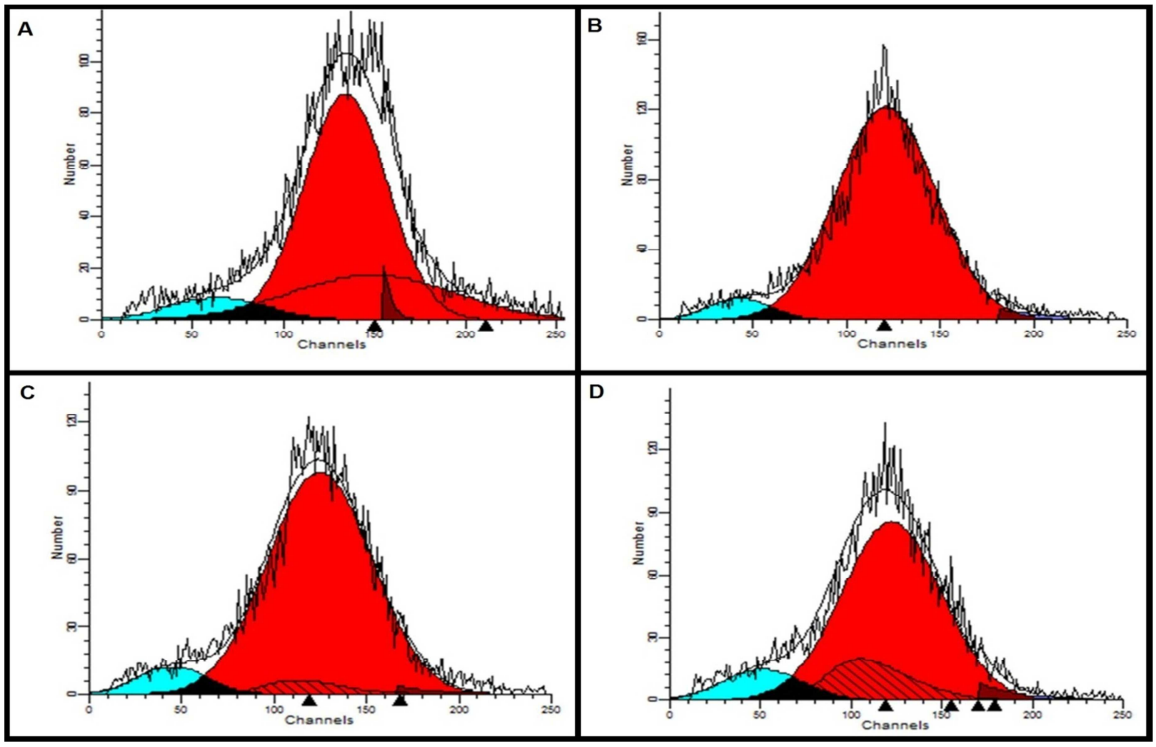
Os Resultados do Ciclo Celular e as Fases Sub-G1, G0/G1, S e G2/M estão apresentados no histograma da (Figura 12).

Gráfico 3 - Fases do Ciclo celular do Elemento Radial da Nadadeira de Tubarão, teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Figura 12 - Ciclo Celular do Elemento Radial da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Legenda: A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4.

5.5.2 Raios Dérmicos

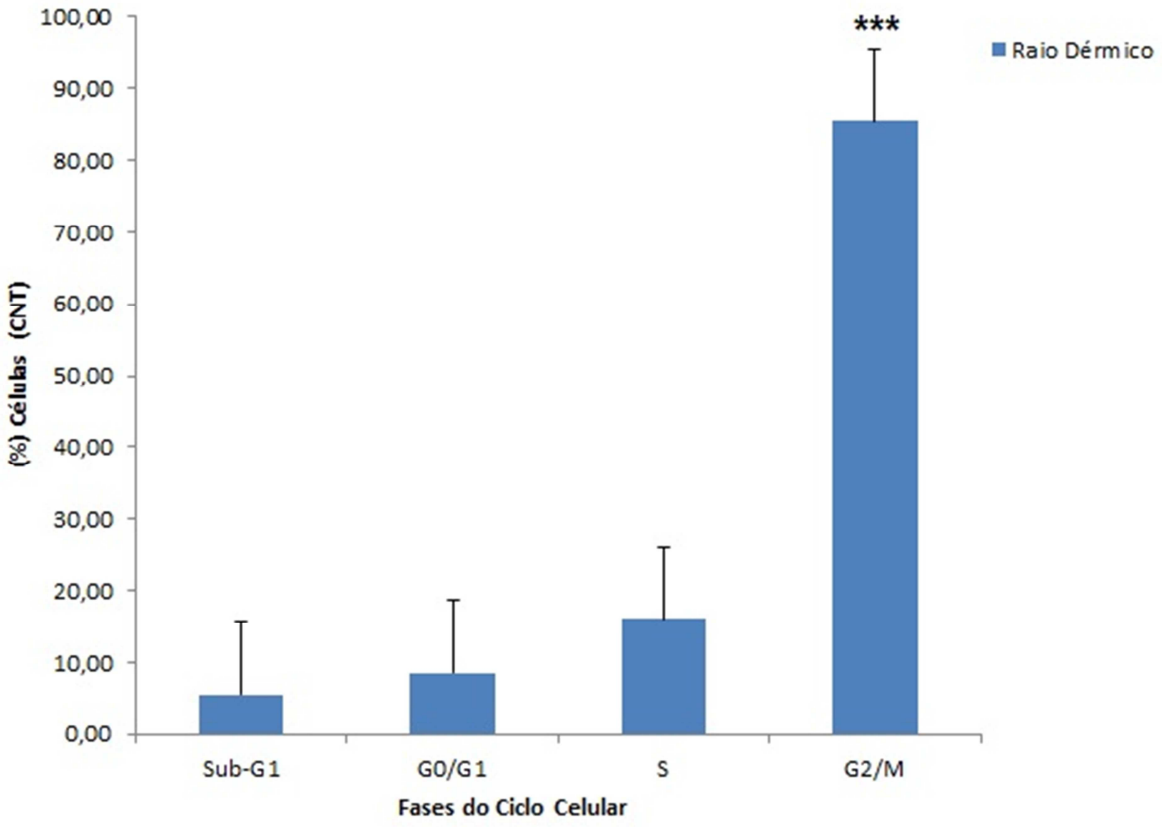
Os Raios dérmicos apresentaram aproximadamente 6% de células na fase Sub-G1. Já na fase G0/G1, houve um aumento para aproximadamente 9% de células nesta fase. A fase S teve um percentual aproximado de 16% de células. Porém a fase G2/M foi maior com aproximadamente 85% de células com alta capacidade proliferativa (Gráfico 4).

A fase Sub-G1 dos Raios Dérmicos, apresentou um valor de aproximadamente 5% das células. Na fase G0/G1 a porcentagem de células foi de aproximadamente 9%.

Na fase S a quantidade de células nesta fase foi de aproximadamente 9%. Porém na fase G2/M o Raio Dérmico apresentou um numero maior de células com 85%.

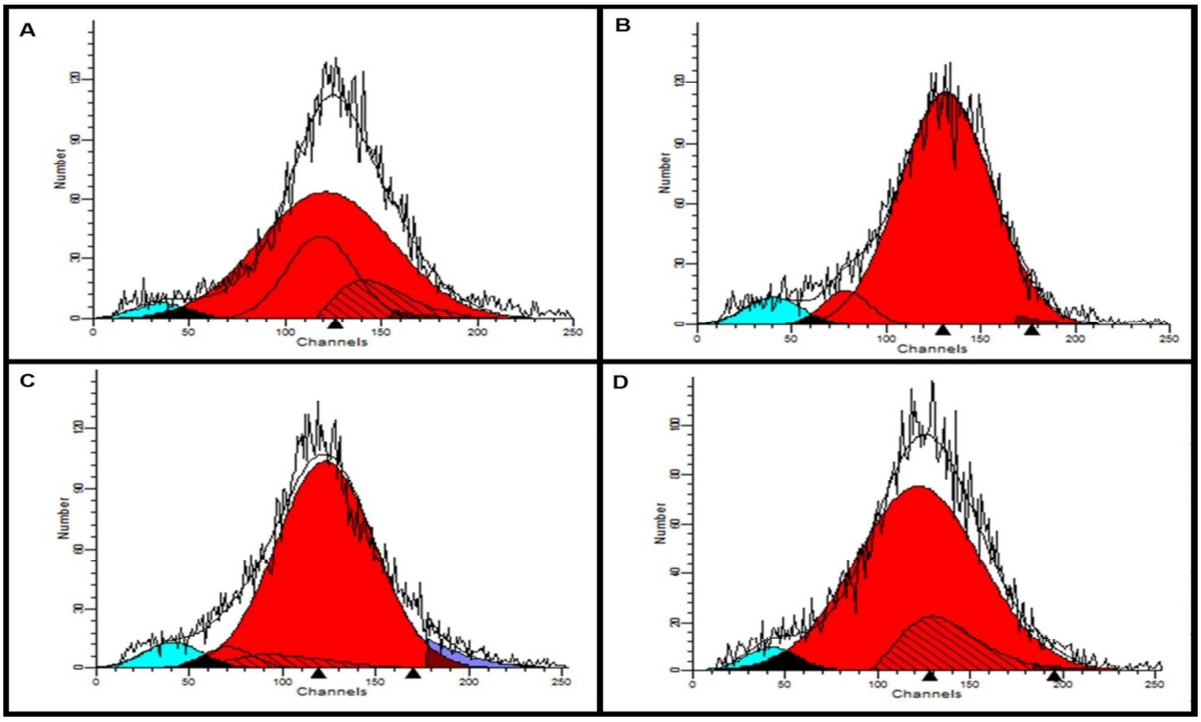
Os Resultados do Ciclo Celular e as Fases Sub-G1, G0/G1, S e G2/M estão apresentados no histograma da (Figura 13).

Gráfico 4 - Ciclo Celular dos Raios Dérmicos, teste de Variância de ANOVA (***p < 0.001)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Figura 13 - Ciclo Celular dos Raios Dérmicos da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*)



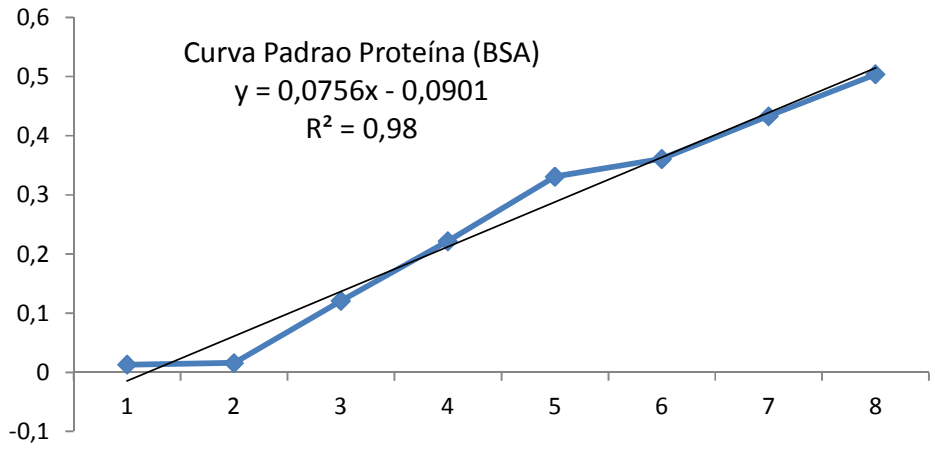
Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Legenda: A: Amostra 1; B: Amostra 2; C: Amostra 3; D: Amostra 4.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO COMPOSTO DA NADADEIRA DE TUBARÃO ATRAVÉS DO MÉTODO DE BRADFORD

Após o preparo do composto conforme descrito na metodologia, a quantificação de proteínas feitas pelo método de Bradford demostrado pela curva padrão da proteína aponta que a quantidade de proteínas encontradas no composto da nadadeira de tubarão atingiu um valo de R igual a 0,98 (Gráfico 5).

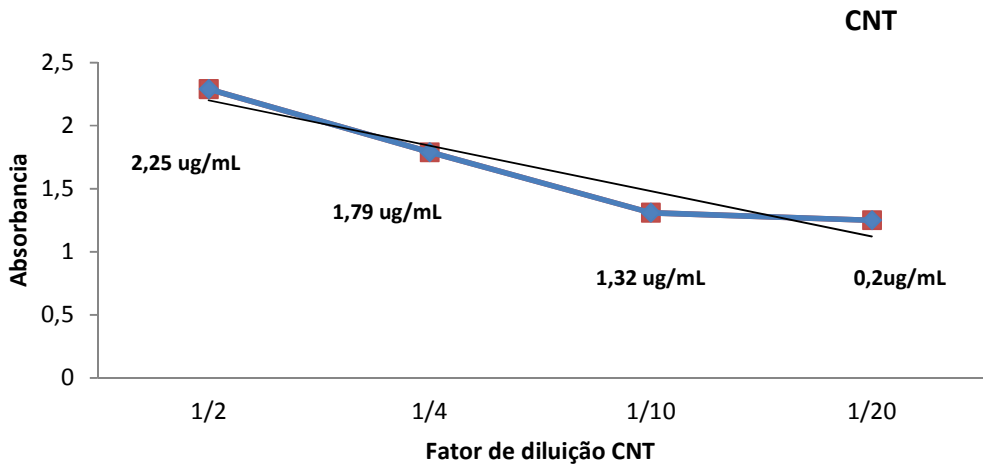
Gráfico 5 - Curva padrão da proteína encontrada no Composto da Nadadeira de Tubarão



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Quanto ao fator de diluição, pode-se constatar que quando o composto foi fracionada para uma concentração de ½, a quantidade de proteína foi de 2,25 µg/mL. Quando fracionado para ¼ a quantidade de proteína cai para 1,79 µg/mL. Conforme a CNT é fracionada, corre um declinio da curva (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Valor da diluição do composto CNT para a obtenção da concentração em µg/mL



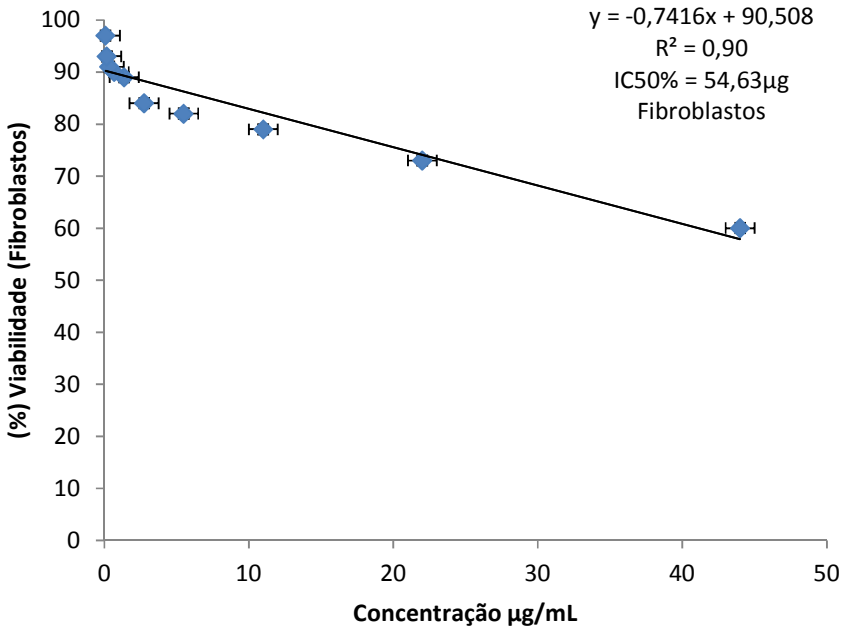
Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

5.7 TESTES DE TOXICIDADE PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT DO COMPOSTO DA CARTILAGEM DA NADADEIRA DE TUBARÃO IC 50%

5.7.1 Em células de fibroblastos FN1

A concentração do composto da nadadeira de tubarão capaz de inibir 50% da atividade da célula de Fibroblastos foi de 54,63 µg/mL como demonstrado na gráfico 7, quando adicionado o CNT nas células de fibroblastos.

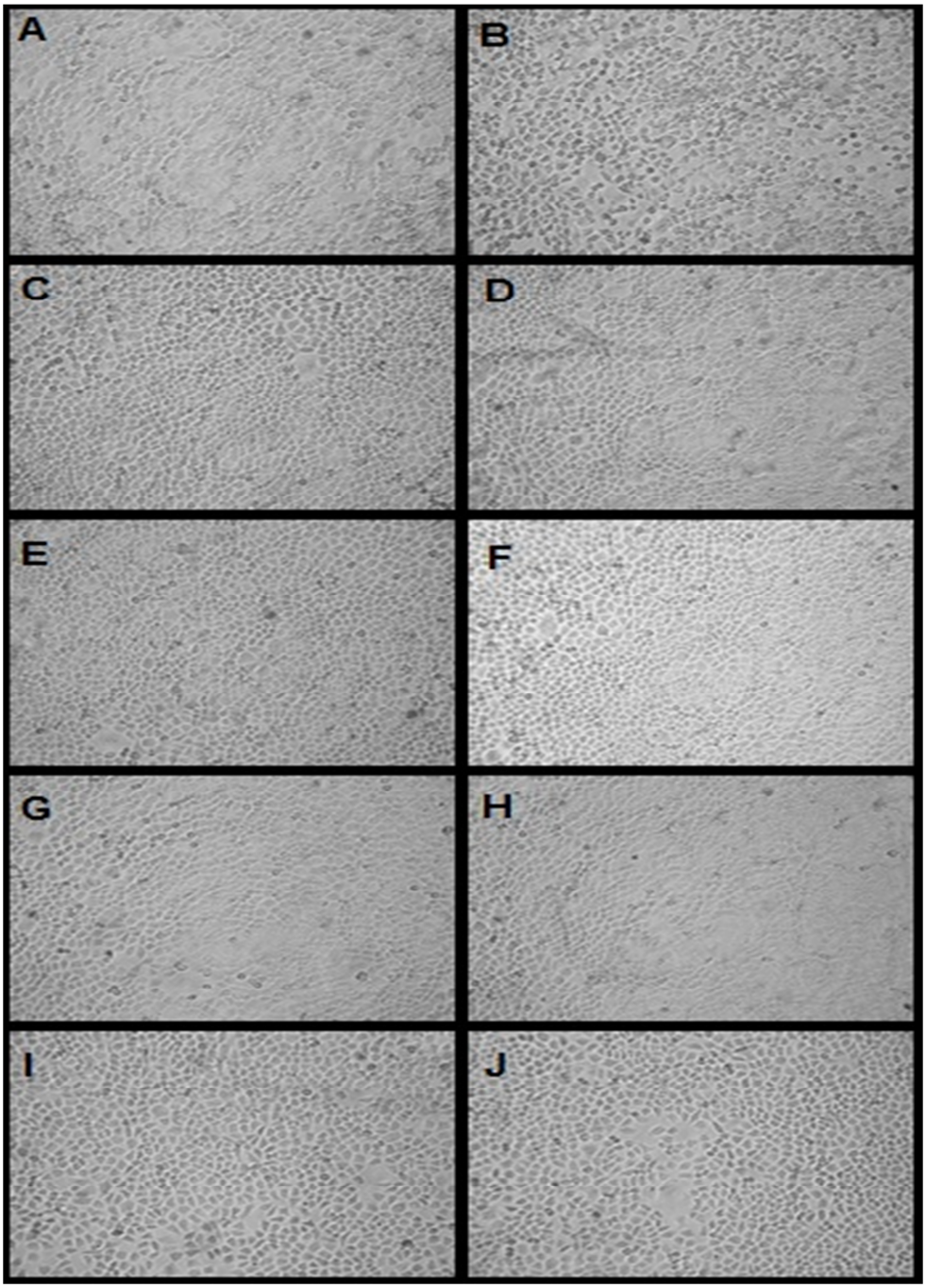
Gráfico 7 - Concentração de IC 50% do Composto da Nadadeira de Tubarão aplicado em células de Fibroblastos FN1



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

A figura 14 demostra as células de Fibroblastos após o tratamento com CNT.

Figura 14 - Cultura de células de FN-1, 24 horas após o tratamento com o CNT



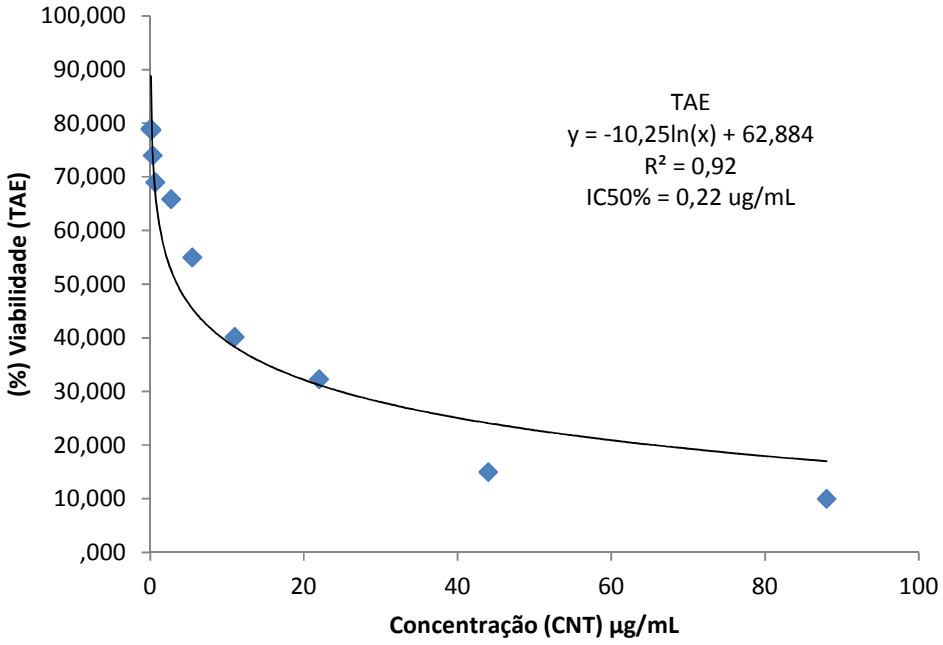
Fonte: MALAVASI-BRUNO, C.E., 2012.

Legenda: A: Controle; B: 44 μg/mL; C: 22 μg/mL; D: 11 μg/mL; E: 5,5 μg/mL; F: 2,75 μg/mL; G: 1,37 μg/mL; H: 0,68 μg/mL; I: 0,34 μg/mL; J: 0,17 μg/mL.

5.7.2 Em células de adenocarcinoma de mama murina (TAE)

A concentração do composto da nadadeira de tubarão capaz de inibir 50% da atividade da célula de Tumor de mama murina (TAE) foi de 0,22 µg/mL como demonstrado na gráfico 8.

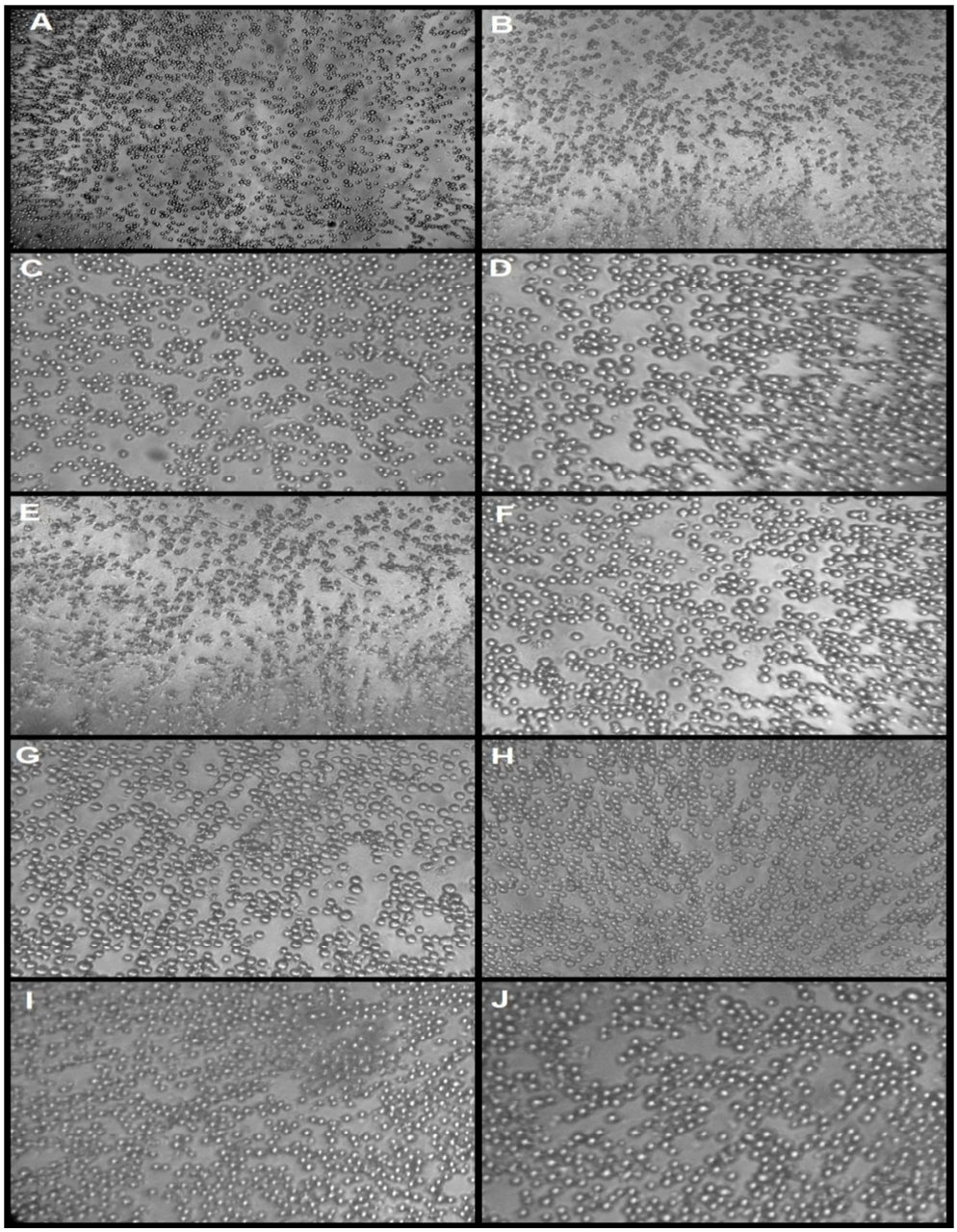
Gráfico 8 - Concentração de IC 50% do Composto da Nadadeira de Tubarão aplicado em células de Tumor de mama murina (TAE)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

A figura 15 demostra as células de Tumor de mama murina (TAE) após o tratamento com CNT.

Figura 15 - Cultura de células de Tumor de mama murina (TAE), 24 horas após o tratamento com o CNT



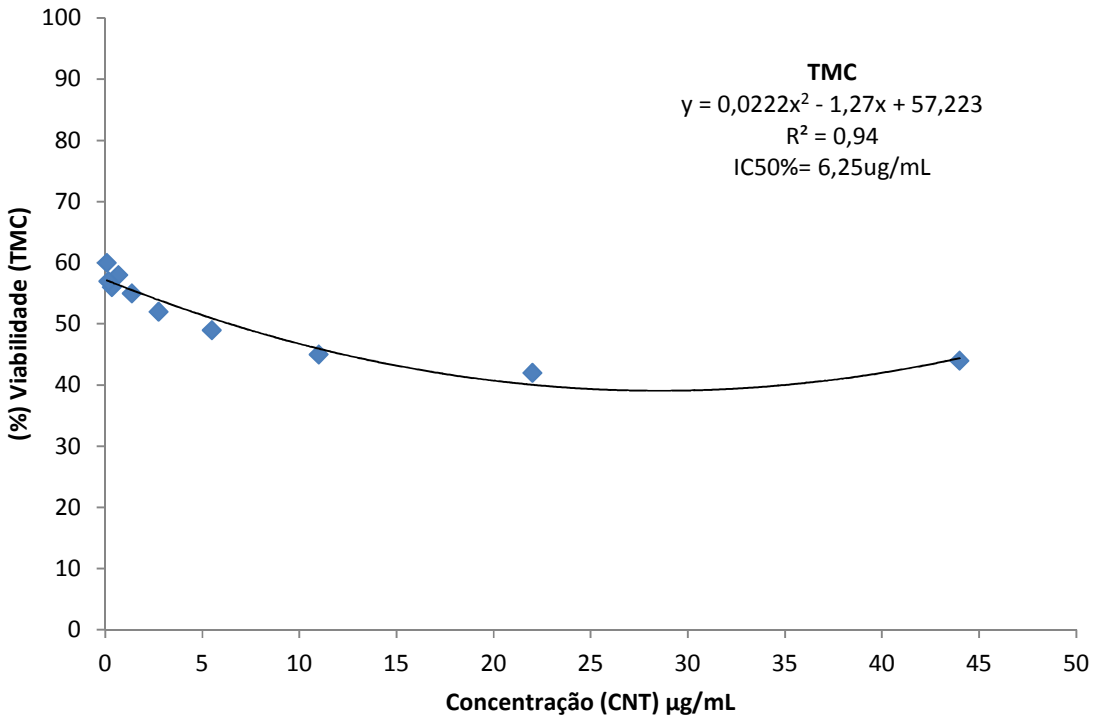
Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Legenda: A: Controle; B: 44 µg/mL; C: 22 µg/mL; D: 11 µg/mL; E: 5,5 µg/mL; F: 2,75 µg/mL; G: 1,37 µg/mL; H: 0,68 µg/mL; I: 0,34 µg/mL; J: 0,17 µg/mL

5.7.3 Em células de Tumor de mama canino(TMC)

A concentração do composto da nadadeira de tubarão capaz de inibir 50% da atividade da célula de Tumor de mama canino foi de 6,25 µg/mL como demonstrado na gráfico 9.

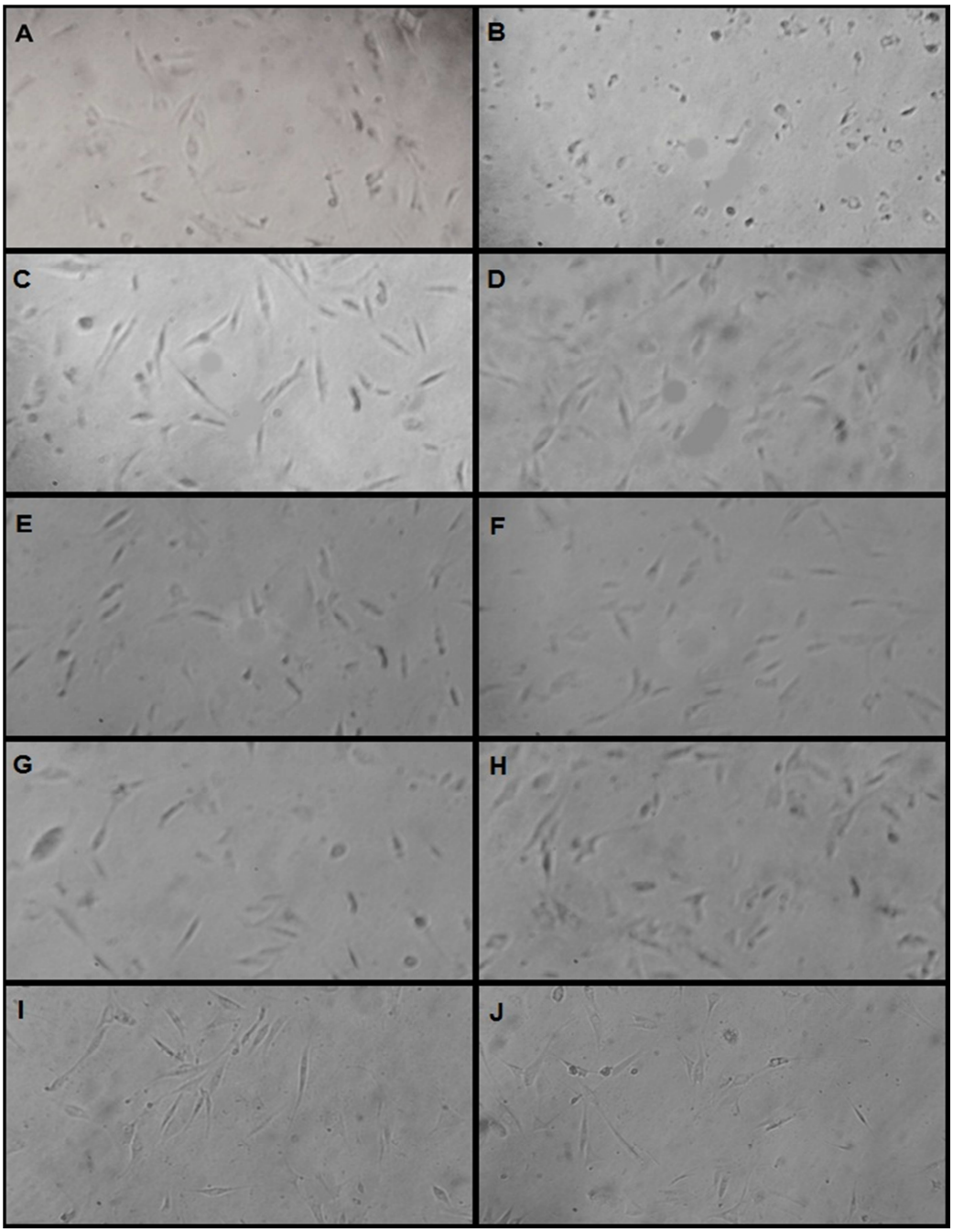
Gráfico 9 - Concentração de IC 50% do Composto da Nadadeira de Tubarão aplicado em células de Tumor de mama canino



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

A figura 16 demostra as células de Tumor de mama canino (TMC) após o tratamento com CNT.

Figura 16 - Cultura de células de Tumor de mama de cão (TMC), 24 horas após o tratamento com o CNT



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

Legenda: A: Controle; B: 44 µg/mL; C: 22 µg/mL; D: 11 µg/mL; E: 5,5 µg/mL; F: 2,75 µg/mL; G: 1,37 µg/mL; H: 0,68 µg/mL; I: 0,34 µg/mL; J: 0,17 µg/mL.

5.8 CICLO CELULAR

5.8.1 Tumor de mama murino (tae) tratado com o composto da nadadeira de tubarão

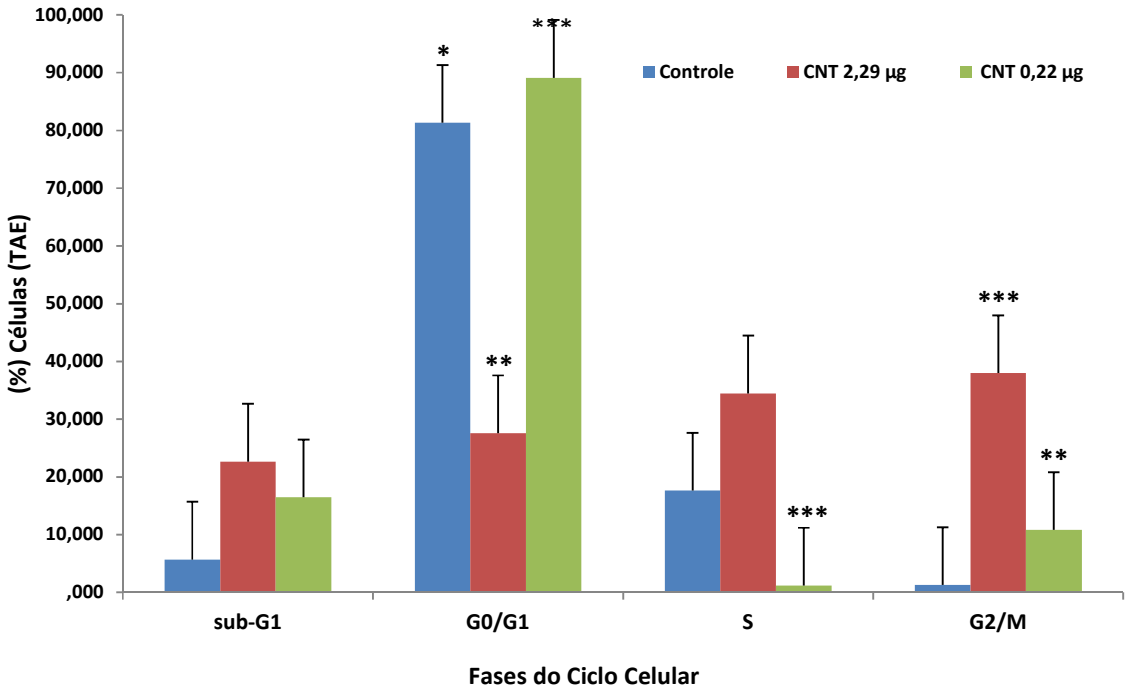
Após 24 horas de tradadas com o CNT, as células de TAE teve um aumento de células em apoptose na fase Sub-G1 quando tratadas na concentração de 2,29 e 0,22μg/mL de CNT quando comparado ao controle não tratado.

Na fase de quiescência (G0/G1) aumentou significativamente a quantidade de células, quando aplicado a concentração de 2,29 μg/mL de CNT em relação a concentração de 0,22 μg/mL (Gráfico 10).

Na fase S do ciclo celular houve uma diminuição significativa na concentração de células quando aplicada a concentração de 0,22 μg/mL de CNT em relação a concentração de 2,29 μg/mL do composto que foi mais expressiva. (Gráfico 10).

Na fase G2/M, a cultura que recebeu o tratamento com a concentração de 2,29μg/mL de CNT houve um aumento significativo na porcentagem de células quando comparada a concentração de 0,22 μg/mL de CNT (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Ciclo celular das células de tumor de mama murina tratado com o Composto da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA. (***p < 0.001; ** p<0,01; *p<0,05)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

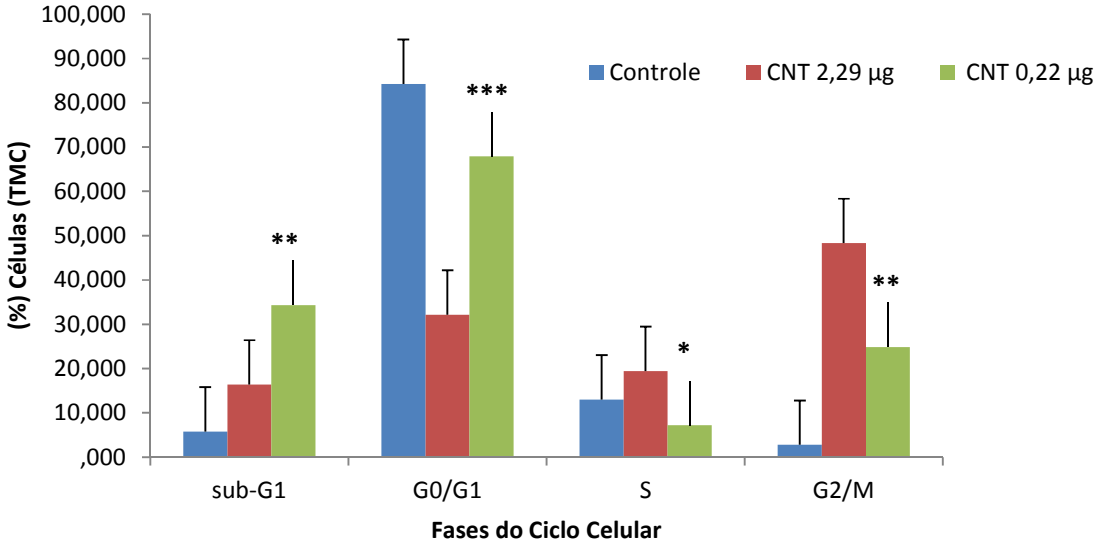
5.8.2 Tumor de mama canino (TMC)

A célula de Tumor de mama canina, após 24 horas de tratamento com 2,29 µg/mL do CNT, apresentou um aumento significativo na fase de quando comparado com o controle. Porém quando tratado com a concentração de 0,2 µg/mL, o aumento foi ainda maior. Na fase G0/G1, quando tratada com a concentração de 2,29 µg/mL do CNT, a quantidade de células teve uma baixa significativa quando comparado ao controle que apresentou uma média de 84% das células enquanto que quando tratadas com a concentração de 2,29 µg/mL de CNT apresentou uma média de 32% de células

nesta fase. Porém quando tratado com 0,2 µg/mL de CNT, houve uma baixa quando comparada com o controle (Gráfico 11).

Na fase de G0/G1, as células tratadas com a concentração de 2,29 µg/mL de CNT, teve um aumento significativo quando comparado com o controle. As células tratadas com 0,22µg/mL de CNT, teve um aumento de células quando comparada ao controle(Gráfico 11).

Gráfico 11 - Ciclo celular das células de Tumor de mama canino (TMC) tratado com o Composto da Nadadeira do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA. (***p < 0.001; ** p<0,01; *p<0,05)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

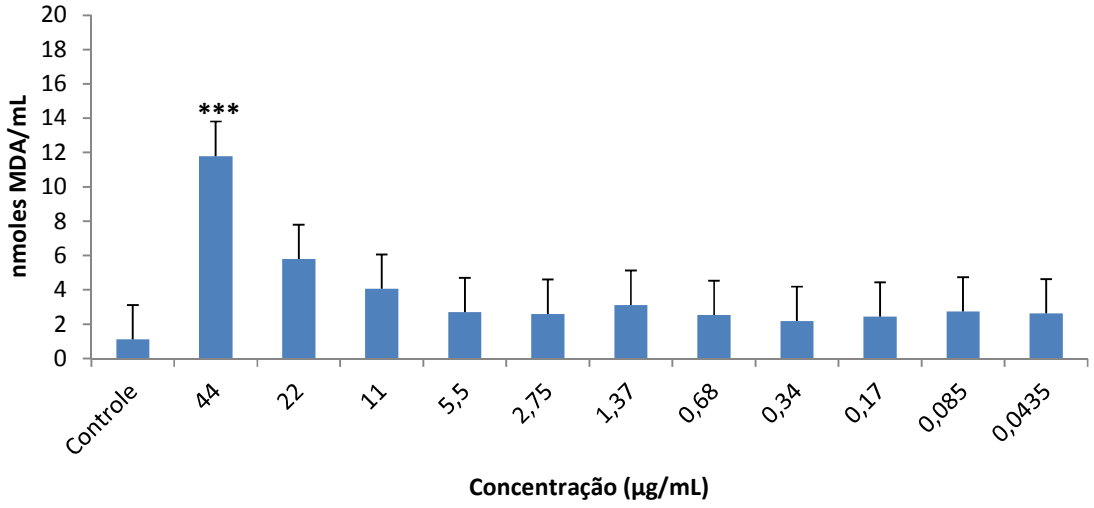
5.9 PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES (LIPOPEROXIDAÇÃO – LPO)

A avaliação de peroxidação lipídica foi realizada com o sobrenadante das amostras de FN-1, TAE e de TMC após 24 horas do tratamento com o CNT.

5.9.1 Tumor de mama murina (TAE)

Os resultados em TAE após 24 horas de tratamento com o CNT mostram uma diferença significativa na quantidade de radicais livres formados reativos na concentração de 44 µg/mL quando comparado ao controle formando nesta concentração uma quantidade de 12 nmoles MDA/mL. Na primeira concentração houve um maior dano oxidativo quando comparado com as demais concentrações onde houve um decaimento gradual conforme diminui a diluição, como demonstrado em nmoles/mL. Gráfico 12.

Gráfico 12 - Produção de radicais livres em células de Adenocarcinoma de mama murina após 24 horas de tratamento com o Composto da Nadadeira Dorsal do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA (***$p < 0.001$)

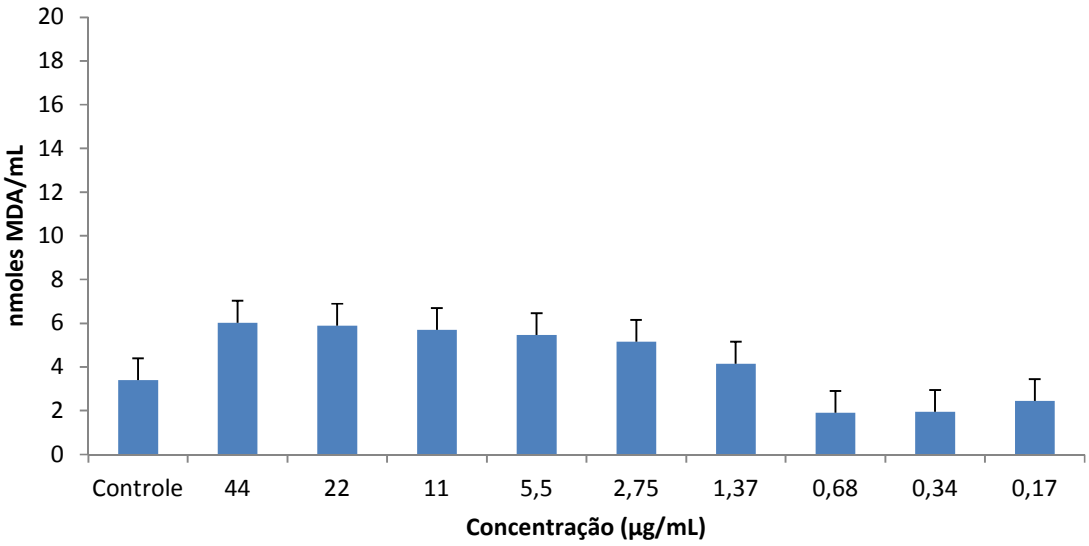


Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

5.9.2 Tumor de Mama Canino (TMC)

Os resultados em Adenocarcinoma de mama canino após 24 horas de tratamento com o CNT houve um aumento significativo na quantidade de radicais livres formados reativos na concentração de 44 µg/mL quando comparado ao controle. Nas concentrações de 44 µg/mL a 1,37 µg/mL houve uma diminuição não significativa porcentagem de radicais livres formados reativos. Após essas concentrações houve um decaimento na concentração de 0,68 µg/mL, tendo um aumentando não significativo nas concentrações de 0,34 µg/mL e 0,17 µg/mL como demonstrado em nmoles/mL na gráfico 13.

Gráfico 13 - Produção de radicais livres em células de Tumor de mama de cão após 24 horas de tratamento com o Composto da Nadadeira Dorsal do Tubarão Azul (*Prionace glauca*)

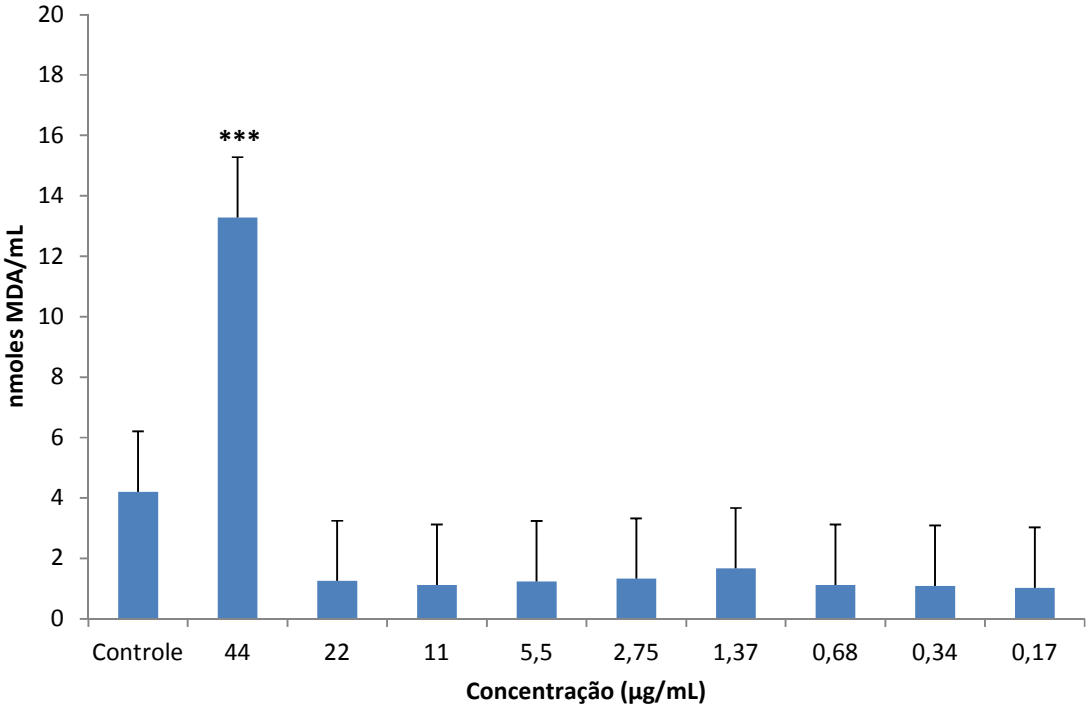


Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

5.9.3 Fibroblastos FN-1

Os resultados em FN-1 após 24 horas de tratamento com o CNT mostram um significativo aumento na quantidade de radicais livres formados reativos na concentração de 44 µg/mL quando comparado ao controle. Porém na partir da concentração de 22 µg/mL houve uma diminuição da quantidade de radicais livres mantida até a concentração de 0,17 µg/mL, mantem-se a quantidade de nmoles/mL abaixo do controle que foi de aproximadamente 4 nmoles/mL, conforme gráfico 14.

Gráfico 14 - Produção de radicais livres em células de FN-1 após 24 horas de tratamento com o Composto da Nadadeira Dorsal do Tubarão Azul (*Prionace glauca*) teste de Variância de ANOVA. (***p < 0.001)



Fonte: MALAVASI-BRUNO, C. E., 2012.

6 DISCUSSÃO

Em nossos estudos a nadadeira dorsal do tubarão azul, possui a margem anterior reta e a margem posterior curvada em forma de “V”, na borda livre é igual a metade da largura da base e de coloração azul escura, corraborando com Hernandez (2009), a partir destes caracteres é possível identificar as nadadeiras como sendo do Tubarão-azul (*Prionace glauca*).

A histologia da cartilagem da nadadeira do Tubarão-azul, demonstrou que é formada de cartilagem hialina, apresentando três regiões distintas, sendo no seu interior formado por condrócitos, na periferia de cartilagem calcificada e nas bordas formada por pericôndrio, concordando com Junqueira e Carneiro (1999), a cartilagem hialina é constituída de Pericondrio, matriz cartilagínea e condrócitos, sendo que o pericôndrio, esta localizado na região mais externa da cartilagem e tanto a matriz cartilagínea e os condrócitos na região mais central (DEAN; SUUMERS, 2006).

Foi localizada uma região na cartilagem da nadadeira como sendo de uma matriz cartilaginosa mais rígida. Segundo Dean e Summers (2006), na cartilagem, pode se encontrar alguns pontos de mineralização de diferentes graus contendo fosfato de cálcio hidroxiapatite, não existindo uma orientação estrutural ou de tamanho dos cristais.

O colágeno tipo I está presente na derme, aponeurose, ossos e tendões, são produzidos pelas células de fibroblastos, possuem fortes ligações entre suas fibrilas que atingem seu grau máximo nos tendões. O colágeno tipo I possui a função de resistir a tensões (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) O colágeno tipo II é encontrado nas cartilagens e associa-se com as proteoglicanas que contém condroitinsulfato, emprestando uma caracteristica de compressibilidade reversível devido à alta hidrofilia que apresentam, funcionando como uma esponja que perde água quando comprimida e volta a sua forma normal com a adição de água. Importante característica para articulações sujeitas a pressões. Esse tipo de colágeno é produzido pelos Condrócitos, e possui a função de resistir a pressão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Em nossos

achados observamos que a cartilagem analisada é formada de fibras de colágeno do tipo I (Coloração vermelha),do tipo II (Amarelo-alaranjado) e tipo III (Coloração verde),

Quando comparadas o tamanho do elemento radial e do raio dérmico pode-se notar que o elemento radial possui 65% de células consideradas de pouca granulosidade e complexidade e 35% consideradas de maior granulosidade. Não houve uma diferença considerável quando comparado com o raio dérmico. A célula animal tem um tamanho aproximado de 10^6 (ALBERTS, et al., 1994). Com isso pode-se sugerir que a grande maioria das células está em um estado de crescimento e maturação.

Neste trabalho a concentração de CNT para inibir 50% das células de fibroblastos foi de 54,63 µg/mL sendo considerada alta quando comparado a de Tumor de mama murina de 0,22 µg/mL e tumor de mama canino, de 6,25 µg/mL, corraborando com os achados Shahrokhi et al.,2012 que nos experimentos tratando com cartilagem de tubarão em tumor de mama humano notou um efeito antiangiogenicos aplicada apenas nos novos vasos e não apresentou efeito toxico sobre as células normais.

Na fase G0/G1 as células tratadas do Tumor de mama murina com 2,29 µg/mL de CNT obteve uma população celular de aproximadamente 27%, e quando tratada com a concentração de 0,22 µg/mL de CNT, ocorreu um aumento considerável para 89% de população celular, fase esta que descrita por SALENS, et al., 2004 que é o intervalo após a mitose durante o qual as células se separam para iniciar a síntese de DNA. Este período é caracterizado pela transcrição genica e tradução, levando a síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA.

Os resultados da LPO em TAE, TMC e FN1 após 24 horas de tratamento com o CNT mostram uma diferença na quantidade de radicais livres formados reativos na concentração de 44 µg/Ml em relação ao controle sem tratamento, de acordo com Benzie, 1996 a LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos Radicais Livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular. A LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia seqüência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para

entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (Vaca,Wilhem, Harms-Ringdahl, 1988; Baber, Harris, 1994).

7 CONCLUSÃO

Os caracteres encontrados na analise macroscópica foi possível identificar que as nadadeiras obtidas como sendo do Tubarão-azul (*Prionace glauca*). A histologia da cartilagem da nadadeira do Tubarão-azul, demonstrou que é formada de cartilagem hialina, apresentando três regiões distintas, sendo no seu interior formado por condrócitos, na periferia de cartilagem calcificada e nas bordas formada por pericôndrio com a presença de colágeno tipo I,II e III.

Os resultados obtidos das amostras do Elemento Radial não evidenciam alterações funcionais, quanto ao armazenamento, transporte e obtenção do suprimento celular, estes são viáveis e satisfatórios.

O composto da cartilagem de tubarão para o tratamento de tumor “in vitro” neste estudo sugeriu que o mesmo apresenta uma atividade anti-tumoral significativa. Mostrou efeito tóxico sobre os tumores de mama murino (TAE) e tumor de mama canino (TMC) em baixas concentrações, não apresentando efeito tóxico nas células de fibroblasto nas mesmas concentrações.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, M. V.; LAZARETTI, C.; CAMARGO, G. D.; LINDEN, R. Estudos pré-analíticos e de validação para determinação de malondialdeido em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 44, n. 2, p. 279-187, 2008.

ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WATSON, James D. **Fundamento da Biologia Celular**. Ed. Artmed: Porto Alegre, 3ª Ed. 2011

BABICH, H.; BABICH, J. P. Sodium lauryl surface and triciosan: *in vitro* cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicology Letter**, New York, v. 91, n. 3, p.: 189-196, 1997.

BABICH, H.; BORENFREUD, E. Cytotoxic and morphological effects od phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studies *in vitro*. **Toxicology in vitro**, New York, v.6, n.6, p.: 493-502, 1992.

BÁEZ, M. E.; MORALES, R. O.; DÍAZ, L. J.; PEÑA, R. C. Cartílago de tiburón: Acciones Biológicas, empleo y perspectivas. **Revista Cubana Investigaciones Biomédicas**, La Habana, v. 20, n. 3, p: 213-222, 2001.

BARBER, A. D., HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmaceutical**, Ancana, v. 34, n. 9, p. 26-35, 1994.

BARGAHI, A.; CHADEGANI, A. R. Angiogenic inhibitor protein fractions derived from shark cartilage. **Rev. Bioscience Reports**, Portland, v. 28, n. 1, p.: 15-21, 2008.

CAMPANA, S. E.; JOYCE, W.; FRANCIS, M. P.; MANNING, M. J. Comparability of blue shark mortality estimates for the Atlantic and Pacific longline fisheries. **Marine Ecology Progress Series**, Kilbirnie, v. 396, p.: 161-164, 2009.

CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. **Biology of Sharks and Their Relatives.** New York: Lybrary of Congress, 2004.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neural red and amido black staining

for rapid , reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, Bologna, v. 17, n. 13, p.: 1259-1264, 1996.
COHEN, P. T. W. Novel protein phosphatases: variety is the spice of life. **Trends in biochemical sciences**, Dundee, v. 22, n. 7, p. 245-251, 1997.

COMPAGNO, L. J. V. Sharks of the world. **FAO Fisheries Synopsis**.Grahamstown, v. 4, n. 125, parte 1, p.: 251-655, 1984.

COMPAGNO, L. J. V. **Sharks and order Carcharhiniformes**, Princeton: Caldwell, 2003.

COSSARIZZA, A. **Measure of mitochondrial membrane potential with fluorescent probe JC-1. West Lafayette: Purdue University, 2012 (**CD-ROM Series) Disponível em: < http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/flow/vol3/16/data/page13.htm> Acesso em 24 jul. 2012.

DEAN, M. N.; SUMMERS; A. P. Mineralized cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. **Zoology**, Jena, v.109, n. 2, p.:164-8, 2006.

DANIEL, J. Frank. **The elasmobranch fishes**. Ed. University of California 1a Ed. 1934

DUPONT, E.; SAVARD, P. E.; JOURDAIN, C.; JUNEAU, C.; THIBODEAU, A.; ROSS, N.; MARENUS, K.; MAES, D. H.; PELLETIER, G.; SAUDER, D. N. Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage extract: potential role in the treatment of psoriasis. **Journal of Cutaneous Medicine And Surgery**, Ste-Foy, v. 2, n. 3, p. 146-152, 1998.

FREITAS-NETTO, R.; KROHLING, W.; ROCHA, M. B.; DI BENEDITTO, P. M. Produção Pesqueira no triênio 2003-2005 pela cooperativa de pesca de Vila Velha, Espirito Santo, Sudeste do Brasil. **Boletim Instituto de Pesca**. Vila Velha, v. 35, n. 4, p.: 663-673, 2009.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The central executioner of apoptosis: mitochondria or caspases? **Trends cellular biology**. San Diego, v. 8, n. 7, p. 267-271, 1998.

HAIL, J. R. N.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptpsis effector mechamisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**. Denver, v. 11, n. 6, p.: 889-904, 2006.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, Ann Arbor, v. 9, n. 6, p.: 691-704, 2004.

HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires**. 2005. 34f. Tese (doutorado) – Agriculture, Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2005.

HAMLETT, W. C. **Sharks, Skates and Rays; The biology of elasmobranch fishes**. Baltimore: Johns Hopkins University, 1999.

HAZIN, F.; LESSA, R. Synopsis of biological information available on Blue Shark, *Prionace glauca*, from the Southwestern Atlantic Ocean. **Collective Volume of Scientific Papers ICCAT**. Rio de Janeiro, v. 58, n. 3, p.: 1179-1187, 2005.

HERNÁNDEZ , S.; ESCÁRATE, C. G.; BORREGO, J. Á.; GONZÁLEZ, M. T.; HAYDE, P. A. A Multidisciplinary Approach to identify pelagic shark fins by molecular, morphometric and digital correlation data. **Revista Hidrobiológica**. Iztapalapa, v. 20, n. 1, p.: 71-80, 2010.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. **Análise da Estrutura dos Vertebrados**. 2 ed. São Paulo: Atheneu Paulo, 2006.

HILLMAN, J. D.; ALBERT, T.; GILLIAM, A. C.; REMICH, S. C. Treatment of Kaposi Sarcoma with oral administration of shark cartilage in a human Herpesvirus 8-Seropositive, human immunodeficiency virus-seronegative homosexual man. **Arch. Dermatology**. Cleveland, v. 137, n. 9, p.: 1149-52, 2001.

HOCKLEY, K.; BAXTER, D. Use of the 3t3 cell.neutral red uptake assy for irriants as na alternative to the rabbit (Draize) test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 6/7, p,: 473-475, 1996.

HOWARD, A.; PELC, S. R. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. **Heredity**. London, v. 26, n.2, p.:261-273, 1953.

JORDAO, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S.; VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel de glutationa reduzida e da vitamina E. **Revista Medicina - Ribeirao Preto**, Ribeirao Preto, v. 31, n.3, p.: 434-449, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KOHLER, N. E.; TURNER, P. A.; HOEY, J. J.; NATANSON, L. J.; BRIGGS, R. Tag and recapture data for three pelagic shark species: blue shark (Prionace glauca), shortfin mako (Isurus oxyrinchus), and porbeagle (Lamna nasus) in the north Atlantic ocean. **Collection Volume of Scientific Papers, ICCAT.** Silver Spring, v. 54, n. 4, p.: 1231-1260, 2002.

KOTAS, J. E.; LIN, C. F.; ALBANEZ, F. F. Observações biológicas do tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), em cruzeiros de prospecção pesqueira na zona econômica exclusiva do Sudeste-Sul do Brasil. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**. Itajaí, v. 1, n. 1, p.: 43-60, 2010.

LEE, C. S.; HAN, E. S.; JANG, Y. Y.; HAN, J. H.; HA, H. W.; KIM, D. E. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxity in the mouse and Dopamine Induced Damage of Brain Mitochondria and Pc12 cells. **Journal of Neurochemistry**. London, v. 75, n. 2, p.: 521-531, 2000.

LEGAT, J. F. A.; VOOREN, C. M. Distribuição e abundância relative do Tubarão-Azul, *Prionace glauca*, no sul do Brasil. **B. Instituto de Pesca.** São Paulo, v. 34, n. 3, p.: 425-432, 2008.

LIMA, P. S; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação Lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 37, n. 3, p.: 293-303, 2001.

LOPRINZI, C. L.; LEVITT, R.; BARTON, D. L.; SLOAN, J. A.; ATHERTON, P. J.; SMITH, D. J.; DAKHIL, S. R.; JR-MOORE, D. F.; KROOK, J. E.; ROWLAND, K. M.; MAZURCZAK, M. A.; BERG, A. R.; KIM, G. P. Evaluation of shark cartilage in patients with advanced cancer: a north central cancer treatment group trial. **American Cancer Society.** Rochester, v. 104, n. 2, p.: 176-182, 2005.

LU, C.; LEE, J. J.; KOMAKI, R.; HERBST, R. S.; FRENG, L.; EVANS, W. K.; CHOY, H.; DESJARDINS, P.; ESPARAZ, B. T.; TRUONG, M. T.; SAXMAN, S.; KELAGHAN, J.; BLEYER, A.; FISCH, M. J. Chemoradiotherapy with or without AE-941 in stage III Non-Small cell lung cancer: A randomized phase III trial. **Journal of National Cancer Institute**. Holcombe Blvd, v.102, n. 12, p.:859-65, 2010.

MAZZOLENI, R. C.; SHWINGEL, P. R. Elasmobranch species landed in Itajaí harbor, Southern Brazil. **Notas Técnicas FACIMAR.** Itajaí, v. 3, p.: 111-8, 1999.

MEJIA, E. G.; DIA, V. P. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cell. **Revista Cancer Metastasis**. Urbana-Champaign, v. 29, n. 3, p.: 511-28, 2010.

NAKANO, H.; SEKI, M. P.; Synopsis of biological data on the blue shark *Prionace glauca* Linnaeus.**Bulletin of Fisheries Research Agency.** v. 6, n. 6, p.: 18-55, 2003.

OLIVIER, P.; TESTARD, P.; MARZIN, D.; ABBOTT, D. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicology In Vitro.** Lestrem, v. 9, n. 2, p.: 133-138, 1995.

QUAGGIO, A. L. C.; KOTAS, J. E.; HOSTIM, M. As capturas do tubarão-azul, *Prionace glauca* Linnaeus (Elasmobranchii, Carcharhinidae), na pescaria de espinhel de superfície (monofilamento), sediada em Itajaí (SC), Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. Itajaí, v. 3, n. 1, p.: 61-74, 2008.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondrian in cell death. **Oncogene**. Belgium, v. 12/23, n. 16, p.: 2861-2874, 2004.

SHWABE, R. F.; BRADHAM, C. A.; UEHARA, T.c-Jun-N-terminal kinases drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. **Hepatology**. Chapel Hill, v. 37, n. 4, p.: 824-832, 2003.

SCHWINGEL, P. R.; MAZZOLENI, R. C. Aspectos da biologia das espécies capturadas por espinhel pelágico na costa sul do Brasil no inverno de 2001. **Notas Técnicas FACIMAR**. Itajaí, v. 8, p.: 75-82, 2004.

SKOMAL, G. B.; NATANSON, L. J. Age and growth of the Blue Shark, *Prionace glauca*, in the North Atlantic Ocean. **Collective Volume of Scientific Papers ICCAT.** Wellington, v. 54, n. 4, p.: 1212-1230, 2002.

SOLIAR, T. L. Dorsal fin in the white shark, *Carcharodon carcarias*: A dynamic stabilizer for fast swimming. **Journal of Morphology**. Durban, v. 263, n.1, p.: 1-11, 2005.

SPRINGER, V. G.; GOLD, J. P. **Sharks in Question**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1989.

STEBEL, M.; VATTA, P.; RUARO, M. E.; DEL SAL, G.; PARTON, R. G. The growth suppressing gas 1 product is a GPI-linked protein. **FEBS Latters**. Padriciano, v. 481, n. 2, p.: 152-158, 2000.

STELL, R. **Sharks of the world**. New York: Facts on File, 1989.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**. 3 ed. Barcelona: Omega S/A, 2003

SZPILMAN, Marcelo. **Peixes Marinhos do Brasil**, Rio de Janeiro: Mauad, 2000.

TSUTSUI, T.; MATSUDO, Y.; TANAKA, Y.; ROCKUKAWA, A.; SATO, H.; OMORI, N.; BARRET, J. C. Quantitative comparison of cytotoxity of dental antiseptics to normal human oral keratinocytes. **Toxicology in Vitro**. Fujimi, v. 8, n. 6. p.: 1253-1258, 1994.

VACA, C. E., WILHEM, J., HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. **Mutation Research.** Stockholm, v. 195, n. 2, p.: 137-149, 1988.

VASKE-JÚNIOR, T.; RINCÓN-FILHO, G. Conteúdo estomacal dos Tubarões Azul (*Prionace glauca*) e Anequim (*Isurus oxyrinchus*) em águas oceânicas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia.** Rio Grande, v. 58, n. 3, p.: 445-452, 1998.

ZHENG, L.; LING, P.; WANG, Z.; NIU, R.; HU, C., ZHANG, T.; LIN, X.. A novel Polypeptide from shark cartilage with potent anti-angiogenic activity. **Cancer Biology & Terapy**. Qingdao, v. 6, n. 5, p.: 775-780, 2007.