



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

Tese de doutorado

**EFEITOS DE DERIVADOS DE COLÁGENO E DE UM ISOLADO
PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO NA INIBIÇÃO DE
LESÕES ULCERATIVAS GÁSTRICAS E TUMORIGÊNESE,
IN VITRO E IN VIVO**

**Geórgia Alvares de Castro
Engenheira de Alimentos**

**Professor Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador**

**Professor Dr. Durvanei Augusto Maria
Co-orientador**

**Campinas - SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C279e Castro, Geórgia Álvares de
Efeitos de derivados de colágeno e de um isolado protéico de soro de leite bovino na inibição de lesões ulcerativas gástricas e tumorigênese, *in vitro* e *in vivo* / Geórgia Álvares de Castro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Co-orientador: Durvanei Augusto Maria
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Colágeno. 2. Soro do leite – Proteínas. 3. Úlcera gástrica.
4. Tumorigênese. 5. Alimentos funcionais. I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Maria, Durvanei Augusto. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Effect of collagen derivates and bovine whey protein isolate in inhibition of gastric ulcerative lesions and tumorigenesis, *in vitro* e *in vivo*

Palavras-chave em inglês (Keywords): Collagen, Whey – Proteins, Gastric ulcer, Tumorigenesis, Functional food

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Carlos Alberto Nogueira de Almeida

Consuelo Junqueira Rodrigues

Gláucia Maria Pastore

João Ernesto de Carvalho

Maria Marluce dos Santos Vilela

Data da defesa: 09/11/2007

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Nogueira de Almeida
(Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP)

Prof. Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues
(Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo – FMUSP)

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(FEA Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
(CPQBA Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela
(Depto. Pediatria FCM Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP)

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador
(FEA Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP)

Campinas, de novembro de 2007.

Dedicatória

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é amor”. (São Tomás de Aquino)

Ao meu marido José Roberto, que tanto esteve ao meu lado neste trabalho

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores” (Sócrates)

Aos meus filhos, Marianne e Lucas

“O amor é paciente, é bondoso; o amor não é invejoso, não é arrogante, não se ensoberbece, não é ambicioso, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda ressentimento pelo mal sofrido, não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”.

(Carta de S. Paulo aos Coríntios)

E aos meus Pais, Conceição e Wander.

“A maravilhosa disposição e harmonia do Universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode”. (Isaac Newton).

Agradecimentos

Ao Professor e Mestre Valdemiro Carlos Sgarbieri, que me apoiou, incentivou, esteve me conduzindo para que juntos fizéssemos deste trabalho o melhor possível e foi sempre muito amigo.

Ao Professor e Pesquisador Durvanei Augusto Maria que me ensinou tudo sobre tumorigênese e carcinogênese, permitindo que eu conhecesse uma nova linha de pesquisa, com o seu apoio e amizade.

À empresa Gelita South America, que me concedeu todos os recursos necessários para condução deste estudo.

Às pessoas de Paulo Reimann e Denise Reis que acreditaram neste projeto e permitiram que eu o fizesse como projeto de pesquisa da empresa.

Ao Professor e Pesquisador João Ernesto de Carvalho que me disponibilizou seu laboratório com toda sua equipe, oferecendo todo o seu apoio.

Aos profissionais Sirlene Tinti, Ana Possenti e Karen que me ensinaram a lidar com os ratos e estiveram ao meu lado realizando os experimentos. A toda equipe do laboratório de farmacologia da CPQBA.

Ao Pesquisador Said Bouhallab do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas, I.N.R.A., Rennes, França que me permitiu conduzir a investigação cromatográfica e de frações de peptídios de colágeno.

Aos colegas da Gelita, Vergimari, Priscila, Daniella, Luzia, Fátima, Mary Vivian, Rodrigo, Mariana, Vivian, Cristhiane e Vagner, que sempre quando necessário me deram seu apoio e colaboração.

À Marlene Palla pela colaboração na compra de reagentes e materiais para tese e ao moto-boy Jefferson que muitas vezes se disponibilizou para atender as minhas solicitações.

Aos colegas Edson Yajima, Cathia Reis e Telma Garcia que sempre se disponibilizaram para troca de idéias sobre este projeto com apoio e colaboração.

Aos Professores do Depan – UNICAMP, Débora Queiroz Tavares, Carlos Ferreira Grosso, Jaime Amaya Farfán e Flávia Maria Netto que sempre tiveram uma palavra de incentivo para finalização e êxito deste projeto.

À Professora Consuelo Junqueira Rodrigues que permitiu o uso do seu laboratório de anatomia da Faculdade de Medicina da USP.

À Professora Yara Maria Michelacci e às técnicas Caroline Zito e Elizabeth Naomi que disponibilizaram o citômetro de fluxo do Departamento de Bioquímica da UNIFESP.

Ao pesquisador Ivo Lebrum do Instituto Butantan que se disponibilizou para discussões e utilização do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Às técnicas do Depan - UNICAMP, Suzana e Eliana, assim como as secretárias, Cidinha e Sônia.

Às minhas auxiliares, Rosa e Mara, que cuidaram dos meus filhos e da minha casa para que eu pudesse finalizar este trabalho. E também à Dalva pela valiosa ajuda.

À companheira do meu grande mestre, Professora Astrid Sgarbieri que sempre me ofereceu sua compreensão e apoio.

À minha amiga Andréa B. Ferreira que sempre me incentivou e acreditou neste projeto.

À amiga Flávia Ramos por ter acreditado neste projeto, sempre com palavras de incentivo.

À amiga Alessandra Teixeira pelo incentivo, apoio e interesse neste projeto.

À minha irmã Vanessa, que sempre acreditou e confiou na finalização deste trabalho, com suas palavras de otimismo.

À minha irmã Carine que sempre torceu pelo sucesso deste projeto, apoiando e passando todo seu positivismo.

Aos cunhados, Juninho e Airton, que estiveram sempre torcendo pelo sucesso deste projeto.

Aos meus pais que acompanharam, mesmo de longe, cada etapa deste projeto oferecendo apoio, orações, presença ao cuidarem da minha filha durante experimentos no I.N.R.A., sempre depositando confiança e dedicação.

Ao meu marido, que foi pai e mãe para nossos filhos nos meus momentos de ausência, que esteve sempre ao meu lado confiando e ajudando para a finalização feliz deste trabalho.

Aos meus filhos, que mesmo não entendendo o que eu estava fazendo longe deles, me deram amor.

À todos que de alguma forma estiveram colaborando, apoiando, confiando neste projeto, meu agradecimento sincero.

À Deus que tudo fez por mim e sempre me ilumina me dando forças para seguir em frente.

ÍNDICE

SEÇÃO	PÁGINA
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	xi
RESUMO GERAL	xv
GENERAL SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS GERAL e ESPECÍFICOS	6
3. REFERÊNCIAS	7
 CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA	 10
Artigo 1: Propriedades Fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino e hidrolisados de colágeno em lesões ulcerativas gástricas	11
Artigo 2: Propriedades Fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino e hidrolisados de colágeno na tumorigênese	47
 CAPÍTULO II: PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ESTUDOS POSTERIORES	 93
Artigo 1: Composition, membranes and chromatographic fractionation and mass spectra characterization of collagen hydrolysates	94
 CAPÍTULO III: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE BOVINO E DE DERIVADOS DE COLÁGENO, SEPARADAMENTE E EM COMBINAÇÕES, NA INIBIÇÃO DE LESÕES GÁSTRICAS PROVOCADAS PELO ETANOL ABSOLUTO	 129
Artigo 1: Protective Effect of Collagen Derivates on the Ulcerative Lesions Caused by Oral Administration of Ethanol	130

Artigo 2: Antiulcerogenic Effect of Administration in Rats of a Whey Protein Isolate (WPI) and Collagen Hydrolysates, alone or in combination, against Ethanol Ulcerative Lesions	147
CAPÍTULO IV: PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS ANTI-TUMORAIS “IN VITRO E IN VIVO” DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO E DERIVADOS DE COLÁGENO	179
Artigo 1: Broad in Vitro Efficacy of Whey Protein Isolate (WPI) and Collagen Hydrolysates Against B16F10 Melanoma Cells	180
Artigo 2: In Vivo Anti-tumoral Activity of Different Dietary Proteins on Melanoma B16F10 in the Presence or Absence of a Chemotherapeutic Treatment	212
Artigo 3: Analysis of Cell Cycle Phases and of Proliferative Capacity in Mice Bearing Melanoma, Maintained on Different Dietary Proteins	240
4. CONCLUSÕES GERAIS	269
ANEXO I – Artigo de úlcera publicado	273
ANEXO II - Equações IC ₅₀ %	277
ANEXO III - Posters SLAN 2006	278
ANEXO IV – Posters FENS 2007	280

ÍNDICE DE TABELAS e FIGURAS

SEÇÃO	PAGINA
CAPÍTULO II:	
Artigo 1:	
Table I: Basic chemical composition of hydrolyzed bovine and porcine collagens and their fractions obtained through KOCH membranes fractionation	118
Table II: Amino acid profile of bovine and porcine collagen hydrolysate	119
Table III: MS data of the peptide of bovine collagen hydrolysate fraction P1 (molecular mass lower than 80KDa)	120
Figure 1: Total, free ammonium content and degree of amidation (%) of bovine and porcine collagen hydrolysate and their fractions obtained through KOCH membranes fractionation	121
Figure 2A. and B: isoelectric focusing of bovine collagen hydrolysate (2A) and porcine collagen hydrolysate (2B) and their fractions obtained through KOCH membranes fractionation	122
Figure 3A: Gel permeation chromatography of bovine collagen hydrolysate (BCH) and their fractions	123
Figure 3B: Gel permeation chromatography of porcine collagen hydrolysate (PCH) and their fractions	124
Figure 4A,B: BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction F1	125
Figure 5A,B BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction F2	126
Figure 6A, B: BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction F3	127

Figure 7A, B: BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction F4	128
---	------------

CAPÍTULO III:

Artigo 1:

Table 1: The ULI obtained for carbenoxolone and beef collagen hydrolysate, single dose gastric intubation	136
Table 2: Dosage effect for pig collagen using ethanol model and single dose gastric intubation	137
Table 3: Bovine and its fractions P1, P2, P3 using ethanol model and single dose gastric intubation	138
Table 4: Porcine and its fractions P1, P2, P3 using ethanol model and single dose gastric intubation	139
Figure 1: Experimental ulcerogenesis protocol	145
Figure 2: Logarithmic regression curve and equation of dose-effect of pig collagen on reduction of the ULI in ethanol model in rats.	146

Artigo 2:

Figure 1: Experimental ulcerogenesis protocol	172
Table 1: Effect of various combinations of WPI and BCH, single dose, in reducing ULI in rats	173
Table 2: Effect of various combinations of WPI and PCH, single dose, in reducing ULI in rats	174
Table 3: Effect of various treatment (double dose) of WPI and BCH or PCH in reducing ULI in rats	175
Table 4: Effect of WPI, BCH, PCH and combinations of WPI with BCH or PCH on decreasing plasma gastrin	176

Table 5: Effect of WPI, BCH, PCH and combinations of WPI with BCH or PCH on stimulating gastric mucosa production of mucus in rats intubated with absolute ethanol (1mL/ rat) **177**

Table 6: Protecting effect to rat gastric mucosa of physiological saline, BCH, PCH and WPI in various amounts and combinations, against ulcerative lesions caused by absolute ethanol. **178**

CAPÍTULO IV:

Artigo 1:

Table 1:IC₅₀%by collagen hydrolysates and WPI on B16F10 cells **204**

Figure 1:Cell cycle phases % of B16F10 in medium with BCH-P1 or one of its fractions obtained through RP **205**

Figure 2: Apoptosis % of B16F10 in médium with BCH-P1 or one of its fractions obtained through RP **206**

Figure 3: Cell cycle phases % of B16F10 in medium with BCH-P1 or one of its fractions at different concentrations obtained through RP **207**

Figure 4: Caspase expression % per B16F10 cell in medium with BCH-P1 or one of its fractions at different concentrations obtained through RP **208**

Figure 5: Caspase expression % per B16F10 cell in medium with BCH-P1 or one of its fractions at different concentrations obtained through molecular sieve fractionation **209**

Figure 6A, B: Cytotoxicity of bovine collagen derivates and WPI at 400µg/mL **210**

Figure 7A, B: Apoptosis % of bovine collagen derivates and WPI at 400µg/mL **211**

Artigo 2:

Table 1: Evaluation of percentage mortality in all dietary groups **234**

Figure 1A and B: Survival rate of all dietary groups non-treated (A) and treated (B) with chemotherapeutic (ChTP)	235
Figure 2A and B: Body weight of all dietary groups non-treated (A) and treated (B) with ChTP	236
Figure 3A and B: Tumor volume of all dietary groups non-treated (A) and treated (B) with ChTP	237
Figure 4A and B: Macroscopic aspect of mice bearing tumor	238
Figure 5: Metastasis % of all dietary groups non-treated and treated with ChTP	239

Artigo 3:

Figure 1: Experimental protocol of tumorigenesis	246
Figure 2A,B: Distribution of cell cycle phases in B16F10 after treatment with diets without (A) or with (B) ChTP using flow cytometry	263
Figure 3A,B: Distribution of apoptosis in B16F10 after treatment with diets without (A) or with (B) ChTP analyzed using flow cytometry	264
Figure 4A,B: Measurements of NOR`s from B16F10 cells from animals which received diet without (A) or with (B) ChTP	265
Figure 5A,B: Histogram referred to cell cycle phases	266
Figure 6A,B,C,D: AgNOR`s pictures of dietary protein groups without ChTP	267
Figure 7A,B, C, D: AgNOR`s pictures of dietary protein groups with ChTP	268

RESUMO GERAL

O principal objetivo deste projeto foi avaliar as propriedades fisiológicas potenciais de hidrolisados de colágeno (HC) e de um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) em relação aos efeitos anti-ulcerativo e anti-tumoral em roedores. O projeto apresenta uma parte tecnológica que envolve a produção do WPI e hidrolisados de colágeno (Gelita) com diferentes distribuições de massa molecular.

Para obter as frações protéicas utilizadas neste estudo, responsáveis por estes atributos, uma caracterização foi conduzida por fracionamento através de microfiltração utilizando tecnologia de membranas e sistema FPLC por cromatografia de permeação em gel e de fase reversa. Estas tecnologias foram utilizadas para obtenção dos hidrolisados de colágeno com diferentes massas moleculares e do isolado protéico de soro de leite (WPI), para possibilitar a caracterização química e avaliações bioquímica/ fisiológica em suas atividades anti-úlceras e anti-tumoral. Os produtos elaborados a partir desta tecnologia de fracionamento foram caracterizados de acordo com o grau de hidrólise, composição de aminoácidos, massa molecular e número de peptídios, utilizando metodologias estabelecidas.

Hidrolisados de colágeno bovino e suíno apresentaram características diferentes quanto ao grau de amidação e teor de amônio total, assim como na eletrofocalização. Os perfis cromatográficos de permeação em gel foram semelhantes, mas a atividade biológica em meio com células de melanoma B16F10 também diferiu.

A combinação destas duas proteínas para avaliação dos efeitos anti-ulcerativo e anti-tumoral, também foi utilizada. Atenção especial foi dedicada a uma melhor compreensão da rota metabólica e mecanismos de ação destas duas proteínas e seus peptídios nos ensaios biológicos (modelo com ratos e camundongos, respectivamente).

Para investigar o efeito anti-ulcerativo, ratos *Wistar* com 250-300g de peso corpóreo foram utilizados. Experimentos com dose única e repetitivas foram feitos para avaliar os efeitos destas proteínas na redução ou inibição da úlcera gástrica.

A participação das substâncias sulfidríla ativas provenientes da glutathione (GSH), aminoácidos e ligações inter e intra- cadeias polipeptídicas, no mecanismo de proteção, foi estudada através da alquilação total do grupo reativo SH pela N-etilmaleimida (NEM). Algumas respostas fisiológicas foram avaliadas como a produção de muco gástrico e gastrina durante o modelo experimental de úlcera induzida por etanol.

A atividade inibitória em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol foi também distinta nos hidrolisados bovino (BCH) e suíno (PCH), apresentando o hidrolisado suíno em torno de 60% de inibição das lesões ulcerativas quando administrado em dose única 750mg/Kg de peso corpóreo. No experimento de dose dupla a porcentagem de inibição das lesões ulcerativas gástricas dos hidrolisados bovinos foi maior que 70% quando administrado 1500 mg/Kg pc. Quando foram realizadas combinações de hidrolisados de colágeno bovino ou suíno com WPI, obteve-se uma combinação otimizada para BCH:WPI (50:50) na concentração de 375mg/Kg, com mais de 70% de inibição das lesões ulcerativas gástricas. Os hidrolisados de colágeno levaram ao aumento da produção de muco na mucosa gástrica e o WPI à inibição com a participação das substâncias sulfidríla não protéica na atividade inibitória das lesões gástricas.

Na avaliação *in vitro* com as células B16F10 e os hidrolisados de colágeno bovino e suíno e suas frações obtidas por micro e ultrafiltração, assim como aquelas provenientes da cromatografia por HPLC de fase reversa, mostraram que estas últimas apresentaram a menor concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀), também apresentando aumento na fase de apoptose com significativo aumento na porcentagem de expressão da caspase-3 nos meios contendo as frações F1, F2 e F3.

O estudo de propriedade anti-tumoral foi conduzido utilizando camundongos C57BL/6J. Animais saudáveis foram injetados (transplantados) com células tumorais de melanoma murino B16F10 na área dorsal para avaliar a implantação tumoral, progressão, caquexia observando a perda de peso e outros sintomas, metástase, capacidade proliferativa do tumor assim como sua classificação de

acordo com o volume, tamanho e número. Os mecanismos nos quais a dieta protéica pode estar envolvida, avaliando a fase do ciclo celular, apoptose e efeitos anti-proliferativos no tecido tumoral foram também objetivos deste estudo. Protocolos utilizando quimioterápico foram seguidos com aquelas dietas protéicas que apresentaram melhor resposta contra a tumorigênese considerando outros mecanismos que poderiam estar envolvidos.

No modelo de tumorigênese *in vivo* com células de melanoma B16F10 observou-se uma menor porcentagem de mortalidade, maior porcentagem de sobre-vida e aspectos macroscópicos vantajosos para o grupo de animais C57BL/6J que ingeriram *American Institute of Nutrition* (AIN-93) tendo como fonte protéica BCH: WPI (50:50) e tratamento quimioterápico. O ciclo celular também sofreu alteração com as diferentes dietas. A fase G0/G1 tanto no grupo com tratamento quimioterápico como no grupo sem quimioterápico foi significativamente aumentada para os grupos dietéticos com BCH e BCH-P1 + WPI. A porcentagem de apoptose aumentou para BCH+WPI com tratamento quimioterápico. A capacidade proliferativa das células B16F10 diminuiu para os grupos de camundongos C57BL/6J que se alimentaram de hidrolisados de colágeno sem tratamento quimioterápico e quando houve quimioterapia associada somente aqueles grupos que receberam a combinação das duas proteínas BCH ou BCH-P1 com WPI tiveram uma diminuição significativa da capacidade proliferativa das células B16F10.

GENERAL SUMMARY

The main objective of this project was to evaluate the potential physiological properties of collagen hydrolysate (CH from Gelita) and a whey protein isolate (WPI) in relation to anti-ulcerative and anti-tumoral effects in rodents. The project presents a technological part, which involves the WPI production with different molecular masses.

To obtain the proteic fractions used in this study responsible for these attributes, a characterization was conducted using fractionation through microfiltration using membranes technology and FPLC system through gel permeation and reverse phase chromatography. These technologies were used to obtain the collagen hydrolysate with different molecular masses and the whey protein isolate (WPI) to allow the chemical characterization and biochemical and physiological evaluations of their anti-ulcerative and anti-tumoral activities. The elaborated products obtained from these fractionation technologies and also the products from GELITA (derivatives of collagen) were characterized according to degree of hydrolysis, amino acids composition, molecular mass and peptide number, using established methodologies.

Bovine and porcine collagen hydrolysates presented different characteristics concerning degree of amidation and total ammonium content, as well as in isoelectric focusing. The chromatographic profiles in gel were similar, but the biological activity in cellular medium of melanoma B16F10 also differed.

Combination of these two types of proteins to evaluate anti-ulcerative and anti-tumoral effects were also done. Special attention was dedicated to better understanding of metabolic routes and mechanisms of action of these two proteins and their peptides in biological assays (models with rats and mice, respectively).

To investigate the anti-ulcerative effect *Wistar* rats (250-300g bw) were used. Experiments with single and double doses were conducted to evaluate the effect of these proteins in reduction or inhibition of gastric ulcer. The participation of active sulfhydryl compounds, from glutathione, aminoacids and inter-, intra- polypeptides chains, in protection mechanism, was studied through alkylation of SH reactive

groups using N-ethylmaleimide (NEM). Some physiological responses were evaluated, as mucus and gastrin production, during experimental model of ulcer induced by ethanol.

The inhibitory activity in gastric ulcer model induced by ethanol was also distinct for these two hydrolysates, bovine (BCH) and porcine (PCH). The porcine hydrolysate presented around 60% of ulcerative lesion inhibition when 750mg/Kg body weight was administrated at single dose. For double dose experiment the percentage of inhibition for bovine hydrolysate was higher than 70% when 1,500mg/Kg bw was administrated. When was tested combinations of either bovine or porcine collagen hydrolysate with WPI a optimized combination was obtained BCH:WPI (50:50) at 375mg/Kg bw of concentration presenting more than 70% gastric ulcerative lesion inhibition. The collagen hydrolysate led to increased mucus production in gastric mucosa while WPI caused in addition an inhibition by non-proteic sulfhydryl compounds participation in the inhibitory activity of gastric lesions.

In vitro evaluation using B16F10 cells, the bovine and porcine collagens hydrolysates and their fractions obtained through micro and ultrafiltration, as well as those obtained by reverse phase chromatography (F1, F2, F3), showed the lowest inhibitory concentration for 50% of cells (IC_{50}), presenting increased apoptosis percentage and a significant increase of caspase-3 expression.

The study of anti-tumoral property was conducted using mice C57BL/6J. Healthy animals were injected (transplanted) with tumoral cells of murine melanoma B16F10 in dorsal area to evaluate the tumoral implantation, progression, cachexia observing the body weight loss and other symptoms, metastasis, proliferative capacity of the tumor, as its classification according to volume, size and number. The mechanisms involving the protein in the diet for evaluating cell cycle phases, apoptosis and anti-proliferative effects in tumoral tissue development were also objectives of this study. Protocols using chemotherapeutic were followed with protein which presented better response against tumorigenesis considering other mechanisms that could be involved.

In tumorigenesis, in vivo model using B16F10 melanoma cells, a lower percentage of mortality, longer survival percentage and better macroscopic aspects were observed for C57BL/6J animal groups, fed American Institute of Nutrition (AIN-93) with BCH:WPI (50:50) as protein source plus chemotherapeutic treatment. The cellular cycle also suffered alteration with different diets. The G0/G1 phase for both groups treated and non-treated with chemotherapeutic increased significantly for the dietetic groups BCH or BCH-P1 + WPI. The apoptosis percentage increased for BCH+WPI+ChTP (with chemotherapeutic treatment). The proliferative capacity of B16F10 cells was reduced in the groups fed collagen hydrolysate without chemotherapeutic treatment and when the chemotherapeutic was associated only the groups that received both proteins BCH or BCH-P1 with WPI showed a significant reduction of proliferative capacity of these cells.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O foco deste projeto concentrou-se nas propriedades fisiológicas do colágeno hidrolisado e das proteínas de soro de leite bovino em relação aos efeitos anti-ulcerativo e anti-tumoral. Além da GELITA SOUTH AMERICA, outros laboratórios participaram neste projeto, tais como: C.P.Q.B.A; Depan (UNICAMP) e Instituto Butantan (Universidade de São Paulo).

Esta linha de pesquisa se enquadra na grande área de estudo dos alimentos e/ ou ingredientes funcionais, os quais podem ter alegações de produzir um impacto na saúde não apenas através do aspecto nutricional, mas também através de modulações metabólicas, melhorando a saúde, reduzindo riscos de infecções e doenças degenerativas e crônicas levando a uma melhor qualidade de vida e aumento da longevidade (1, 2).

O desenvolvimento de alimentos funcionais requer verificação científica da eficácia, mecanismo e segurança do alimento. Dentre os componentes alimentícios de importância quanto à atividade fisiológica estão as proteínas às quais tem sido atribuídas algumas propriedades importantes: inibição do crescimento tumoral (derivados de colágeno, proteínas de soro de leite e inibidores de proteases), inibição de lesões do sistema digestivo (proteína de soro e colágeno hidrolisado) e efeito anti-hipertensivo (peptídios de caseína, proteínas de soro, proteína de peixe, zeína e colágeno) dentre outras (3, 4, 5, 6, 7, 8).

Para a avaliação dos derivados de colágeno quanto à inibição de lesões do sistema digestivo, alguns estudos têm enfatizado a importância do colágeno no uso médico como material absorvivo em estado liofilizado como uma esponja ou mesmo em estado sólido ou líquido para controle de hemorragia e também regeneração do tecido digestivo (7).

Algumas hipóteses tem sido formuladas para explicar tais propriedades funcionais do colágeno. Alguns autores sugerem que devido ao colágeno pertencer à matriz extracelular, ele interage com as células via receptores, os quais apresentam diferentes funções para manter a homeostase através do mecanismo de

regeneração, um tipo de mecanismo transdutor responsável pelo sinal liberado em nível celular. Este mecanismo pode ser gerado devido às propriedades piezelétricas do colágeno (habilidade de desenvolver uma carga elétrica proporcional a um esforço mecânico) e grupos reativos polares que são formados durante o movimento intra e intermolecular. Esta interação do colágeno e as células depende da organização ordenada das fibrilas de colágeno (7).

Portanto, colágeno tem sido utilizado para regeneração tecidual, principalmente devido algumas propriedades importantes tais como: imunogenicidade, capacidade iônica de atrair componentes do sangue que são essenciais para a regeneração do tecido, agregação plaquetária, indutor na promoção de coagulação sangüínea, homeostase e proteção mecânica das células digestivas permitindo que elas fiquem no trato digestório por um tempo suficiente para promover a recuperação tecidual (7).

Considerando a eficácia da proteína isolada de soro de leite na inibição de lesões ulcerativas digestivas, alguns estudos têm enfatizado a importância desta proteína na prevenção e controle de algumas patologias (2). Algumas hipóteses tem sido formuladas para explicar tal efeito. A proteína de soro apresenta algumas seqüências de glutamil-cistina que parece resistir à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestório monogástrico, portanto os peptídios com esta seqüência seriam liberados e absorvidos, servindo como substrato para a síntese de glutathione que exerce uma ação protetora contra o desenvolvimento de lesões ulcerativas da mucosa gástrica. A presença de um agente antioxidante na mucosa gástrica tem sido reportado (3, 4). É sabido que altas quantidades de substâncias sulfidríla não protéicas na mucosa gástrica, representada principalmente pela glutathione reduzida, estão fortemente associadas à citoproteção gástrica devido a sua capacidade de evitar a ação maléfica dos radicais livres tóxicos às células da mucosa (3, 4, 5). A importância dos compostos contendo grupos sulfidríla (SH), incluindo a glutathione, na citoproteção gástrica da mucosa contra agentes ulcerogênicos, suporta a investigação sobre inibição do WPI nas lesões digestivas (1, 2).

A carcinogênese pode ser arbitrariamente dividida em três fases distintas: indução, promoção e progressão tumoral. Uma vez que a indução ocorre pela ação de um agente mutagênico, certos constituintes da dieta podem atuar como moduladores na promoção assim como na inibição da progressão tumoral. Vários autores têm concluído que a dieta é, direta ou indiretamente, responsável por pelo menos 35% de todos os registros de causas de câncer. As observações da relação entre conteúdos de aminoácidos na dieta leva a uma forte afirmação sobre a teoria corrente de que uma nutrição apropriada levará à melhora da defesa imune contra o desenvolvimento de tumor. É bem conhecido que a incidência e tamanho de tumores são afetados pelo sistema imune (9).

Em relação ao efeito anti-tumoral dos derivados de colágeno, há um estudo com gelatina de pele suína no qual é mostrado o efeito anti-tumoral in vitro em células de hepatoma murino MH134. Este efeito foi comparado com o efeito da gelatina de osso bovino (BB), 5-Fluorouracil (5-FU) e 7-ethyl-10-hydroxycamptothecina (SN-38). Sugeriu-se que a gelatina de pele suína induziria a apoptose nas células MH134 quando avaliada em citometria de fluxo e uma apoptose incerta quando analisado em gel de agarose por eletroforese e microscopia eletrônica. A eletroforese em gel de agarose mostrou um padrão típico do DNA e o achado na microscopia eletrônica revelou figuras características de caso de apoptose para gelatina de pele suína. SN-38 também mostrou um padrão de DNA e mudanças ultra-estruturais de apoptose. 5-FU não mostrou o padrão de DNA, mas a microscopia eletrônica revelou alterações celulares e necrose. Por outro lado, a gelatina de osso bovino não induziu a apoptose e necrose. Evidenciou-se que a gelatina de pele suína induz a apoptose pela inibição da proliferação das células de hepatoma murino MH134 e leva a alterações bioquímicas e morfológicas in vitro, comparada com 5-FU, SN-38 e gelatina de osso bovino (8). Apoptose, ou morte programada da célula é um importante mecanismo da maioria das células usadas para selecionar negativamente células usualmente deletérias ao hospedeiro. Há uma variedade de eventos moleculares rápidos e distintos que ocorrem em células apoptóticas (10).

É importante investigar o efeito anti-tumoral utilizando ambas as fontes de derivados de colágeno: pele bovina e suína. Isto surgiu de uma hipótese sobre reação auto-imune do colágeno tipo II na cartilagem (11, 12), mostrando que este efeito depende do tipo de colágeno, podendo este atuar como anticorpo e assim participar do sistema imune.

Alguns estudos mostraram o efeito positivo da proteína de soro de leite bovino quanto à atividade anti-tumoral (9).

A dieta com proteína de soro de leite parece inibir significativamente a incidência e o crescimento de câncer de cólon induzido quimicamente em camundongos. Uma estimulação imune mais forte e uma inibição tumoral do concentrado protéico de soro de leite foi também demonstrados quando comparado com caseína e soja (9).

Há uma população enorme que inclui milhões de crianças e adultos (ao redor de 6 a 15 milhões) que apresentam as lesões digestivas que levam a disfagia que na maioria das vezes é devida a problema de refluxo, sendo que 13,5 milhões são representados por pessoas idosas. Estima-se que este dado será multiplicado por 16 nos próximos 20 anos (13).

A investigação das proteínas de leite (soro de leite e caseína) e seus hidrolisados enzimáticos sobre a fisiologia permite confirmar e aprofundar no estudo de alguns aspectos fisiológicos tais como:

- ✓ O concentrado de proteínas do soro de leite (WPC) tem capacidade de reduzir os níveis de colesterol do sangue e hepático em ratos (14, 15).
- ✓ O WPC e seus hidrolisados têm a capacidade de inibir lesões ulcerativas causadas pelo etanol e pela indomethacina em ratos (3, 4, 5).
- ✓ O WPC e seus hidrolisados têm a capacidade de estimular a síntese de glutathione (GSH) em vários órgãos de ratos e camundongos (16, 17).
- ✓ O WPC tem a capacidade de inibir o desenvolvimento do câncer de cólon induzido pelo azoximetano, em ratos (16).
- ✓ O WPC e seus hidrolisados estimulam a produção do anticorpo (IgM) em ratos mediante estímulo com eritrócitos de carneiro (16, 17).

- ✓ A ingestão continuada de um WPC conduziu a um aumento no nível de glutatona nos eritrócitos e aumentou a população dos linfócitos TCD₄⁺ em crianças infectadas com o vírus HIV-1 (18).

A respeito dos derivados do colágeno, além de propriedades tecnológicas e funcionais, recentemente alguns efeitos sobre a fisiologia tem sido estudadas (7, 8, 11, 12, 19). Os autores citados mostraram efeitos sobre a fisiologia usando a ingestão do hidrolisado de colágeno que causa os seguintes benefícios:

- ✓ Auxilia na manutenção de articulações saudáveis, fortificando os ligamentos (12, 19);
- ✓ Promove uma melhoria na densidade óssea (11, 12, 19, 20);
- ✓ Em um estudo recente, mostrou-se *in vitro* que os derivados do colágeno de pele suína apresentaram efeito anti-tumoral, promovendo a morte programada das células cancerosas (apoptose) (8).

Os derivados do colágeno não são proteínas caras, porém não apresentam alguns aminoácidos essenciais (principalmente triptofano), sendo ainda limitado nos demais. Por outro lado, a proteína do soro é cara e difícil de ser obtida a partir do leite, mas apresenta um perfil equilibrado dos aminoácidos do ponto de vista nutricional.

Em testes preliminares (não publicado), observou-se que o colágeno hidrolisado e o concentrado de soro de leite mostraram uma ação sinérgica ou complementar na inibição das lesões ulcerativas induzidas pelo etanol, em ratos.

Conseqüentemente, existe a possibilidade de que estas proteínas possam também apresentar um efeito sinérgico quanto a ação anti-tumoral, justificando o interesse pela pesquisa aqui proposta.

2. OBJETIVOS GERAL e ESPECÍFICOS

O objetivo geral desta pesquisa foi a avaliação de possíveis efeitos inibitórios de hidrolisados de colágenos de peles suína e bovina, com diferentes massas moleculares, contra lesões da mucosa gástrica induzidas pelo etanol, em ratos, e contra ação anti-tumoral *in vitro* e *in vivo* em células de melanoma murino.

Os objetivos específicos poderão ser descritos como seguem:

2.1. Produção de um isolado protéico de soro de leite bovino (WPI), em quantidades suficientes para conduzir os estudos experimentais.

2.2. Produção de frações de colágeno hidrolisado, com diferentes massas moleculares e caracterização das principais frações através da composição de aminoácidos, número de peptídios e massas moleculares, através de métodos cromatográficos.

2.3. Avaliação de possível ação anti-ulcerativa causada por etanol, em ratos, das frações de colágenos e combinações destas com WPI.

2.4. Estudo comparativo “screening *in vitro*” para detectar frações de colágeno com possível efeito anti-tumoral através de testes de atividade anti-proliferativa, apoptótica, citotóxica e determinação da IC50 (concentração inibitória para 50% das células).

2.5. Estudo comparativo (*in vivo*) para avaliar o potencial anti-tumorigênico comparativo entre o WPI e as frações de colágeno selecionadas “*in vitro*”, em modelos de transplante de células de melanoma em camundongos da linhagem C57BL/6J, mantidos em dietas com diferentes proteínas adicionadas na presença ou ausência de tratamento com quimioterápico.

3. REFERÊNCIAS

1. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite bovino. *Revista de Nutrição, Campinas* 17(4): 397- 409, 2004.
2. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Rev.* 9: 136 – 155, 2004.
3. Rosaneli CF, Bighetti AE, Antônio MA, Carvalho JE, Sgarbieri VC. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions, caused by ethanol ingestion. *Journal of Medical Food*, 5(4): 221-228, 2002.
4. Rosaneli CF, Sgarbieri VC, Bighetti EA, Antônio MA, Carvalho TE. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate in the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin, in rats. *Journal of Medicinal Food* 7(3): 309-314, 2004.
5. Mezzaroba LFH, Carvalho TE, Ponezi AN, Antônio MA, Monteiro KM, Possenti A, Sgarbieri VC. Antiulcerative properties of bovine alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal* 16(9): 1005-1012, 2006.
6. Bounous G, Batist G, Gold P. Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Lett.* 57(2):91-4, 1991.
7. Santos, CDI. Ação do colágeno extraído de tendões bovinos (colágeno tipo I) na recuperação de lesões da mucosa duodenal induzidas por lectinas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Dissertação de mestrado do Departamento de Ciência da Nutrição, Unicamp, 1992.
8. Ito N, Kojima T, Nagath H, Ozeki N, Yoshida Y, Nonami T. Apoptosis induced by culturing MH134 cells in the presence of porcine skin gelatin *in vitro*. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceutical*, 17(4): 379-384, 2002.
9. Dias NFGP, Sgarbieri VC, Jacobucci HB, Rangel HA, Tanikawa C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in mouse. *Lait* 86: 1-14, 2006.
10. Ormerod, M.G. *Flow Cytometry*. Oxford University Press, 3rd. Edition. 2000.

11. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of ^{14}C -labelled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *Journal of Nutrition*, 129: 1891-1895,1999.
12. Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Research*, 311: 393-399, 2003.
13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Comunicação Social, Projeção da População do Brasil, 30 agosto 2004.
14. Jacobucci, HB; “Características nutricionais e efeitos sobre lipídeos sanguíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados à caseína e proteínas de soja comerciais”. Dissertação de Mestrado, curso de Ciência da Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1999.
15. Jacobucci, HB; Sgarbieri, VC; Dias, NFGP; Borges, PZ; Tanicawa, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and proteins and liver cholesterol. *Nutrition Research*, 21: 905-915, 2001.
16. Dias, NFGP. “Estudo comparativo de propriedades imunoestimulatória e anti-tumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino de caseína e de um isolado protéico de soja, comerciais .” Dissertação de Doutorado, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2003.
17. Sgarbieri, VC; Rangel, HÁ; Zinsly, PF; Pacheco, MTB; Dias, NFGP. Novel nutritional and physiological functions of milk proteins. In: *Annals IV World Conference of Food Science and Technology*, Wuxi, China, 2000.
18. Moreno, YMF. Influência das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em crianças com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Dissertação de mestrado, Curso de Ciência da Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2002.

19. Moskowitz, RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 30: 87-99, 2000.
20. Wu, J.; Fujioka, M.; Sugimoto, K.; Um, G.; Ishimi, Y. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *J Bone and Mineral Metabolism*. 2004, 22:547-553.

CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA

ARTIGO 1: “Alterações Fisiológicas Produzidas pelas Proteínas do Soro de Leite Bovino e Hidrolisados de Colágeno em Lesões Ulcerativas Gástricas”.

A ser publicado na Revista de Nutrição / Brazilian Journal of Nutrition

ARTIGO 2: “Alterações Fisiológicas Produzidas pelas Proteínas do Soro de Leite Bovino e Hidrolisados de Colágeno na Tumorigênese”.

A ser publicado na NUTRIRE, revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN)

Alterações Fisiológicas Produzidas pelas Proteínas de Soro de Leite Bovino e Hidrolisados de Colágeno em Lesões Ulcerativas Gástricas.

Geórgia A Castro¹, Valdemiro C Sgarbieri¹.

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, SP, Brasil.

Proteínas de Soro e Colágeno em Lesões Gástricas.

Whey Protein and Collagen in Gastric Lesions

Palavras-chave: proteínas de soro de leite, hidrolisado de colágeno, lesões ulcerativas gástrica, agente ulcerogênico

Resumo

Esta revisão trata principalmente da atividade biológica das proteínas de soro de leite bovino e derivados de colágeno, hidrolisado ou não, no modelo de úlcera gástrica. O aprofundamento da compreensão da fisiologia gástrica também é descrito com o objetivo de relacionar a inibição às lesões ulcerativas gástricas e mecanismo do sistema gástrico. Foram mencionados alguns estudos com as proteínas de soro de leite em diversos modelos de indução de úlcera gástrica, com etanol, indometacina, estresse por frio e reserpina. Proteínas como a α -lactalbumina também apresentou efeito no modelo de úlcera induzida por etanol. Já para os derivados de colágeno, apenas poucas referências foram encontradas.

Summary

This review deals mainly with whey proteins and collagen derivatives, hydrolysates or not, against gastric ulcerative lesions. The gastric physiology also is mentioned in order to correlate the gastric ulcer inhibition with the most probable mechanisms involved in gastric ulcer models. It was found some studies with whey proteins as potential inhibitors of ulcers induced by various models such as, ethanol, indomethacin, stress promoted by cold and reserpine. The α -lactalbumin also showed positive effect in ulcer gastric model induced by ethanol. With regard to collagen only a few articles were found.

Introdução

Nesta revisão pretendeu-se pesquisar na literatura trabalhos que pudessem comprovar, ou pelo menos dar algum suporte sobre alegações de propriedades funcionais e ou fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino (WPI) bem como da gelatina e outros derivados de colágeno, como agentes de importância na proteção da mucosa gástrica contra substâncias ulcerogênicas.

Para compreender melhor possíveis mecanismos de ação dessas proteínas na defesa de lesões gástricas, procurou-se aprofundar na anatomia, fisiologia e mecanismos bioquímicos envolvidos na função gástrica.

Propriedades fisiológicas das proteínas do leite bovino

A indústria de leite oferece como produtos manufaturados muitas frações protéicas como caseínas e soro de leite intensamente utilizados por possuírem várias propriedades funcionais e tecnológicas importantes (1,2). Desde a década de 1980, a utilização destes produtos derivados do leite, aumentou significativamente por representarem importante acréscimo à economia das indústrias leiteiras (3).

O soro de leite é formado por um grupo heterogêneo de proteínas com características especiais (4). Apresenta uma rica e variada mistura de proteínas com propriedades químicas, físicas, funcionais e tecnológicas (5). Estas propriedades dependem, em parte, da concentração em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) nas proteínas do soro de leite, as quais representam aproximadamente 20% do total de proteínas do leite bovino. Os outros 80% são caseínas (6).

Efeitos biológicos e fisiológicos das proteínas do soro de leite são atribuídos às frações α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, soroalbumina, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, além de uma variedade de substâncias bioativas, incluindo hormônios, fatores de crescimento celular e citocinas, que estão presentes em concentrações que podem ser consideradas significativas quanto a benefícios ao organismo. Estas frações protéicas têm sido implicadas em inúmeros efeitos biológicos observados em estudos com humanos e animais (4).

Baruchel et al (7) revelaram quais as concentrações dos componentes do soro de leite que são citados como responsáveis pelas propriedades funcionais fisiológicas deste produto. Na

molécula da albumina do soro bovino encontram-se 17 resíduos de cistina e 6 sequências de ácido glutâmico-cistina. Na lactoferrina há 17 resíduos de cistina e 4 sequências de ácido glutâmico-cistina. Na α -lactoalbumina há 4 resíduos de cistina e na β -lactoglobulina, 2 resíduos de cistina.

Várias pesquisas realizadas (5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) no Brasil e no exterior, em diferentes modelos experimentais (animais, humanos e células *in vitro*) utilizando a proteína do soro de leite bovino têm comprovado suas ações sobre o funcionamento do organismo, incluindo aumento da capacidade imunomodulatória, ação antibacteriana e antiviral, estímulo da absorção de minerais e função intestinal, aumento da síntese de hormônios, ação anticancerígena, aumento no combate às infecções e processos inflamatórios, promoção da síntese de glutatona, além do efeito citoprotetor da mucosa gástrica.

Meister (17), Cotgreave e Gerdes (18) mencionaram que a glutatona é uma molécula multifuncional, composta por três aminoácidos, cisteína, glicina e glutamato, formando o tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, que exerce sua atividade bioquímica através do grupamento sulfidrila de sua estrutura. A glutatona é encontrada em todas as células do organismo, sendo que sua síntese intracelular ocorre a partir de seus precursores, porém a cisteína é fator limitante para sua formação. Mínimas quantidades de cisteína são encontradas em alimentos como clara de ovo crua, leite, carnes, porém são suficientes para que o organismo utilize-a para síntese da glutatona (17).

A glutatona tem um papel central na proteção à célula contra os efeitos danosos de bactérias, vírus, poluentes e radicais livres. É essencial na manutenção dos grupos tióis das proteínas e outros componentes, está envolvida no transporte de aminoácidos e participa da iniciação e progressão de células de defesa do sistema imune. Sem a glutatona, importantes antioxidantes como a vitamina C e E não poderiam desempenhar suas funções biológicas. Além de interagir com várias drogas, participa também como cofator das enzimas formaldeído desidrogenase, maleilactoacetato isomerase, glioxilase, prostaglandina endoperoxidase, isomerase e outras enzimas similares como a glutatona peroxidase e a glutatona redutase (17, 19, 20).

Resultados obtidos (21) com o concentrado protéico de soro de leite bovino (WPC) na inibição de lesões ulcerativas, através de diferentes modelos de indução da úlcera gástrica verificou-se que o WPC reduziu o índice de lesões ulcerativas (ILU) de 23,3%, não diferente significativamente em avaliação estatística comparado com a cimetidina (controle positivo, agente antiulcerogênico no modelo de indometacina) e quando administrado em dose única, no modelo etanol, inibiu 74,4% do ILU. Quando o WPC foi administrado em dose repetida, promoveu uma redução de 50,1% ($p<0,001$) comparado com a cimetidina, quando a indometacina foi o agente lesivo. Em experimento subcrônico utilizando WPC e cimetidina como controle positivo, o WPC reduziu o ILU em 44,0% ($p<0,01$) e a cimetidina 72,1% ($p<0,001$). Ficou demonstrado que o WPC apresentou melhor atividade antiulcerogênica a partir de tratamento repetitivo no modelo de úlcera induzida por indometacina e esta atividade não aumentou com doses sucessivas. A dose efetiva 50% de inibição do ILU (DE_{50}) para o WPC foi de 756,2 mg/Kg de peso corpóreo para o rato (21). No modelo agudo de úlcera induzida por etanol, a carbenoxolona (controle positivo) demonstrou uma redução do ILU de 87%, enquanto que o WPC reduziu o ILU em 40,7%, ($p<0,001$) comparados à salina fisiológica (controle negativo). No tratamento repetitivo observou-se uma redução no ILU para 73,1% ($p<0,001$) para o WPC e de 86,5% para a carbenoxolona. No tratamento subcrônico a redução do ILU pelo WPC foi de 64,2% e pela carbenoxolona de 87,5% ($p<0,001$) e quando comparado com o modelo repetitivo seu efeito protetor foi igualmente eficaz. A dose efetiva 50% (DE_{50}) para o WPC no modelo etanol foi de 1310mg/ Kg de peso corpóreo do rato, sendo este valor maior que aquele obtido no modelo de indometacina, devido à maior agressão à mucosa gástrica promovida pelo etanol. Os dados sugerem que o mecanismo de ação do WPC possa estar relacionado com a citoproteção gástrica, por apresentar índices significativos de inibição das lesões gástricas comparados à droga antiulcerogênica específica utilizada como controle positivo (15, 21).

O modelo de estresse por imobilização e frio desencadeia a secreção ácida gástrica e por isto tem sido bastante utilizado. O WPC foi avaliado neste modelo e no modelo de reserpina não tendo apresentado redução significativa do ILU, o que sugere que a sua atividade antiulcerogênica não ocorre devido a inibição da produção ácida gástrica (21).

No estudo do mecanismo de ação do WPC através da promoção da síntese da glutathione foi utilizada sulfoximina de butionina (BSO), bloqueador da síntese de glutathione, em modelo agudo e repetitivo de úlcera induzida por etanol, onde o WPC foi capaz de inibir apenas parcialmente as lesões da mucosa gástrica, evidenciando a participação da glutathione na citoproteção gástrica, embora outros mecanismos devam estar envolvidos nesta proteção. A utilização da N-etilmaleimida (NEM), alquilante dos grupamentos sulfidrilos envolvidos no mecanismo da citoproteção, nos modelos agudos e repetitivos de úlcera induzida por etanol evidenciou uma diminuição da ação protetora do WPC, indicando que as substâncias sulfidrilas são responsáveis, em parte, pela proteção da mucosa gástrica (15, 21).

Matsumoto et al. (16) relataram que uma proteína isolada do soro de leite bovino, a α -lactalbumina foi capaz de diminuir significativamente a lesão na mucosa gástrica no modelo de úlcera induzida por indometacina, sugerindo que parte desta função protetora poderia ser através do estímulo que esta proteína é capaz de promover à síntese das prostaglandinas, agente protetor da mucosa gástrica contra diferentes agressões no estômago.

Segundo Baruchel (7) o WPC possui elevada concentração de α -lactalbumina, que pode estar relacionada ao seu efeito protetor no modelo de indução de úlcera por indometacina Matsumoto et al. (16). Para confirmar esta hipótese, Mezzaroba et al. (22) avaliaram a capacidade de uma α -lactalbumina comercial com a preparada em laboratório, em proteger a mucosa gástrica de lesões ulcerativas causadas pela indometacina e etanol absoluto. A α -lactalbumina comercial inibiu 44% e a α -lactalbumina obtida em laboratório 12% do ILU, no modelo indometacina. Para o modelo etanol não foi encontrada diferença estatística entre as duas α -lactalbuminas, variando a inibição de 32% a 50%. O conteúdo de prostaglandina E_2 (PGE_2) e muco aumentaram na mucosa após a ingestão das duas α -lactalbuminas, indicando que a proteção foi devida, em parte, à estimulação da síntese de PGE_2 e muco. Também foi observada a participação dos compostos sulfidrilos na proteção da mucosa gástrica.

Efeito do colágeno em lesões gástricas ulcerativas.

Na avaliação de derivados de colágeno quanto à proteção e regeneração de lesões do sistema digestivo, alguns estudos têm enfatizado a importância do colágeno no uso médico como material absorvivo em estado liofilizado como uma esponja ou mesmo em estado sólido ou líquido para controle de hemorragia e também regeneração do tecido digestivo (23). Estas características podem ser devido às propriedades do colágeno de agregar plaquetas, atuar como indutor de coagulação sangüínea, mantendo a homeostase.

Algumas hipóteses têm sido formuladas para explicar tais propriedades funcionais do colágeno. Alguns autores sugerem que devido ao colágeno pertencer à matriz extracelular ele pode interagir com as células, os quais apresentam diferentes funções para manter a homeostase através do mecanismo de regeneração: um tipo de mecanismo transdutor responsável pelo sinal liberado em nível celular. Este mecanismo pode ser gerado devido às propriedades piezelétricas do colágeno e grupos reativos polares que são formados durante o movimento intra e intercelular. Esta interação do colágeno e as células depende da organização ordenada das fibrilas de colágeno (23).

Portanto, colágeno tem sido utilizado para regeneração tecidual, principalmente devido a algumas propriedades importantes tais como: imunogenicidade, capacidade iônica de atrair componentes do sangue que são essenciais para a regeneração do tecido, agregação plaquetária, indutor de coagulação sangüínea, homeostase e proteção mecânica das células digestivas permitindo que o colágeno permaneça no trato digestivo por um tempo suficiente para promover a recuperação tecidual (23).

Fisiologia gástrica. O trato alimentar fornece ao organismo suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes. Para desempenhar esta função é necessário: movimento do alimento ao longo do tubo digestivo; secreção de sucos digestivos e digestão do alimento; absorção dos produtos da digestão, da água e dos vários eletrólitos; circulação do sangue através dos órgãos gastrointestinais para transportar as substâncias absorvidas; controle de todas essas funções pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal. No trato gastrointestinal há funções específicas, algumas para simples passagem do alimento, como a do esôfago; outras para o início de transformação do alimento, como o estômago; e outras para digestão e absorção, como do intestino delgado (24).

Anatomicamente, o estômago divide-se em 3 porções: fundo, corpo e antro pilórico; sendo limitado por 2 sistemas esfínterianos: o esfíncter esofágico inferior, na parte superior ou proximal do estômago; e o esfíncter pilórico ou piloro, na parte inferior ou distal do estômago (24).

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em duas regiões glandulares: a mucosa oxíntica e a mucosa antral. A mucosa oxíntica é mais extensa, ocupando o corpo e o fundo, e é o sítio da secreção de ácido clorídrico. É formada por glândulas oxínticas, que são constituídas de células parietais (ou oxínticas), células principais, células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafinas (ECL). No colo glandular, predominam as células produtoras de muco, que protegem a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções originadas nas glândulas (25, 26, 27).

As glândulas da mucosa antral apresentam os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto as células parietais (24). A inervação do estômago compreende fibras extrínsecas e intrínsecas. A inervação intrínseca é constituída por dois plexos principais, o plexo mioentérico que inerva as camadas musculares e regula a função motora, e o plexo submucoso que inerva a mucosa e regula a absorção e as secreções gastrointestinais (28). Neurônios de ambos os plexos recebem aferências do sistema nervoso central através de fibras do sistema nervoso parassimpático e simpático (inervação extrínseca) e de outros neurônios entéricos, incluindo neurônios sensoriais e interneurônios. Estes circuitos neuronais permitem regular a função motora e secretora do tubo digestório (29).

A inervação simpática do trato gastrointestinal é realizada principalmente por fibras pós-ganglionares que inervam diretamente os vasos sanguíneos e o músculo liso, inibindo a motilidade e a atividade secretora do sistema gastrointestinal, porém estimula a contração da *muscularis mucosae* e de alguns esfíncteres (27, 29).

Em geral, as fibras do parassimpático terminam nos gânglios do plexo mioentérico. As fibras aferentes do vago inervam diretamente as células parietais e realizam sinapses com as células ganglionares do sistema nervoso entérico (SNE), estimulando a atividade motora e secretora do intestino (27, 29).

Úlcera péptica. A úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo

liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (30). Calcula-se que 15 entre 1000 indivíduos sofram desta afecção, sendo maior a ocorrência em mulheres entre 40 e 70 anos de idade. A úlcera gástrica tem se revelado um dos problemas mais comuns de saúde pública. Cerca de 50% dos indivíduos adultos sadios queixam-se de queimações gástricas, indicativas de lesões e formações de úlceras na mucosa, decorrentes de uma má-alimentação e estresse adicionado ao estilo de vida da população (31, 32). Além de sua elevada incidência, os custos de suas complicações, particularmente hemorragias e perfurações, constituem pesado ônus para o indivíduo e para os sistemas assistenciais (32, 33).

Tanto as úlceras localizadas no estômago quanto as do duodeno são referidas como úlceras pépticas. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno (5x), onde 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%) (33).

Sua incidência é ligeiramente maior nos homens em relação às mulheres (1,3:1) e, apesar de ocorrerem em qualquer idade, a úlcera duodenal ocorre com maior frequência na faixa de 30-55 anos, enquanto a úlcera gástrica na faixa de 50- 70 anos (33).

Etiologia da úlcera péptica. Segundo Szabo (34), a lesão celular ou tecidual da mucosa gástrica pode ocorrer por causas adquiridas ou inatas. As cinco causas mais comuns de lesão celular ou tecidual ocorrem por: (a) hipóxia e isquemia (resultante da diminuição do fluxo sanguíneo ou do decréscimo da hemoglobina ou ainda da diminuição das enzimas antioxidantes dos tecidos); (b) por agentes químicos (como monoaminas, eicosanóides, endotelinas, drogas sintéticas, e principalmente substâncias químicas ingeridas propositadamente como o etanol); (c) por agentes biológicos (como vírus, bactérias, particularmente a *Helicobacter pylori*, fungos, parasitas, levando a reações imunológicas que geralmente são desenvolvidas para a defesa do organismo, entretanto produzem radicais livres tóxicos que contribuem para a injúria tecidual); (d) por fatores físicos (*stress*, temperaturas extremas, força mecânica); (e) por defeitos genéticos.

As úlceras provavelmente resultam de diferentes mecanismos patogênicos e, independente de sua etiologia, esta é formada quando ocorre um desequilíbrio entre fatores agressores da mucosa, sejam eles endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (etanol,

antiinflamatórios não esteroidais, fumo), e os fatores protetores da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico) (35, 36).

A infecção por *H.pylori* está associada com o desenvolvimento de gastrite, úlceras, e a possibilidade de malignidades gástricas. A bactéria primeiramente penetra na camada da mucosa gástrica e então se liga a alvos específicos da mucosa e células epiteliais. A infecção resulta em alterações reversíveis da glicosilação das mucinas que favorecem a fixação da bactéria. Antígenos do grupo sanguíneo como oligossacarídeos fucosilados, sialilados e sulfonados estão envolvidos na ligação da *H.pylori* às mucinas gástricas mediadas por uma variedade de adesinas bacterianas. A degradação do muco gástrico pela *H.pylori* através de proteases e sulfatases tem sido proposta por uns e rejeitada por outros. A ação da uréase gerando amônia aumenta o pH o qual desestabiliza a camada de muco. Entretanto, não é suficiente para o colapso da camada de muco e juntamente com a ligação da bactéria ao muco, há um favorecimento da sobrevivência da *H.pylori* na camada mucosa (37).

O etanol é um agente irritante local da mucosa gástrica e capaz de destruir a camada estacionária formada pelo muco e bicarbonato que tem a função de proteger o estômago contra o suco gástrico e outros agressores químicos (32,38). Este agente indutor é ainda descrito na literatura para definir a participação de substâncias inibidoras das lesões ocasionadas pelo bloqueio da citoproteção gástrica, através de precipitação protéica, ocasionando um aumento de radicais livres tóxicos para as células (39, 40, 41).

O etanol diminui significativamente o conteúdo de grupamentos sulfidrila da mucosa gástrica. Estes efeitos lesivos são produzidos por radicais livres acumulados nas células (40, 42). Estudos mostraram que o mecanismo de citoproteção é mediado pelas prostaglandinas e substâncias sulfidrila da mucosa que impedem o aumento da permeabilidade vascular, e ainda bloqueiam a ação dos radicais livres tóxicos sobre a mucosa (43,44).

A carbenoxolona é uma droga antiulcerogênica, obtida a partir das raízes e rizomas de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). O mecanismo de ação desta droga está relacionado com o aumento dos níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica através da inibição das enzimas que promovem o catabolismo das prostaglandinas, além da inibição da secreção da pepsina.

Para tanto, esta droga é recomendada para modelos de úlcera gástrica que estejam envolvidos com a citoproteção gástrica (41, 45).

Modelos experimentais com animais servem para reproduzir a ação dos causadores de úlceras gástricas, para avaliar a atividade de importantes agentes com atividade antiulcerogênica, além da finalidade de determinar a atividade de drogas frente a diferentes agentes ulcerogênicos (41).

Fatores protetores da mucosa gástrica. A mucosa gástrica possui uma barreira dinâmica, permitindo a passagem de certos íons e moléculas para o corpo e restringindo a entrada de outros. Esta proteção não é realizada apenas por uma barreira anatômica, mas por uma série de mecanismos de defesa consecutivos que mantêm a integridade da mucosa (46).

A defesa da mucosa gástrica pode ser dividida em fatores pré-epiteliais, epiteliais e sub-epiteliais. Esta divisão é arbitrária, pois as funções epiteliais como um todo funcionam em conjunto para prevenir as lesões (46). Assim, deve-se ressaltar que esta divisão é realizada apenas para fins didáticos.

Proteção pré-epitelial. O epitélio gástrico é coberto por uma camada aderente e contínua de muco gelatinoso e visco-elástico, que promove uma barreira física entre o lúmen gástrico e a superfície das células apicais. Um gradiente de pH é formado, com um pH consideravelmente maior na superfície das células apicais que na solução contida no lúmen gástrico. Assim, a difusão de macromoléculas do lúmen para a superfície epitelial, incluindo as pepsinas, é prevenida ou restrita (47).

As características estruturais de barreira são primeiramente indicadoras da função fisiológica e alterações na sua composição que relaciona com patologias gastrointestinais já identificadas. Durante a última década, avanços significantes nas técnicas analíticas relacionadas ao conhecimento da codificação genética das proteínas mucinas tem mostrado a importância do papel da camada mucosa e sua relevância nas doenças gastrointestinais (37).

A elevada massa molecular das mucinas é responsável pela propriedade visco-elástica da barreira da mucosa. As mucinas são abundantemente expressas nos tecidos epiteliais e são caracterizadas por um número variável de sequências peptídicas repetidas ricas em serina, treonina, e prolina que carregam um grande número de oligossacarídeos ligados na cadeia

protéica na posição orto (*O*-). Até o momento 12 genes foram descritos associados à membrana baseado na função que apresentam como secretores de substâncias viscosas extracelulares ou géis poliméricos visco-elásticos ou localizados como âncoras em membranas no glicocalix. Dois clusters tem sido reportado, genes codificadores de mucinas MUC2, MUC5AC, MUC5B, e MUC6 no cromossomo 11p15.5, e MUC3, MUC11, e MUC12 no cromossomo 7q22 (37).

Técnicas histoquímicas para detecção de mucinas quanto a habilidade de detectar carboidrato vem sendo utilizada para classificar alterações em algumas patologias. Antígenos de carboidratos parecem estar relacionados com o status da doença, progressão, diagnóstico, e prognóstico, mas não são limitados somente a mucinas isoladamente, ocorre em outras glicoproteínas e glicolípides celulares (37). As mucinas estão envolvidas na etiologia e também diagnóstico da metaplasia intestinal gástrica (IM) associada com a ulceração gástrica, infecção por *Helicobacter pylori*, e o risco de câncer gástrico.

A mucosa estomacal normal se caracteriza pela expressão da MUC1, MUC5AC, e MUC6. Altos níveis de MUC2 e MUC3 aparecem na metaplasia. O paciente com *H.pylori* positivo exibe um aumento da MUC6 na superfície das células do muco e uma redução da MUC5AC (37).

O muco gástrico ocorre em 3 formas: a mucina solúvel presente no suco gástrico; o muco (aderente) insolúvel cobrindo as células da mucosa; e o muco presente nas células secretoras de muco, dispostas entre as células apicais (48).

O muco é único no trato gastrointestinal, no qual a secreção, particularmente no estômago, é uma camada espessa de gel aderente à superfície da mucosa. O papel da camada de gel é a proteção da mucosa e estruturalmente criando uma camada estável, não misturada para suportar a neutralização na superfície do ácido e ação como barreira de proteção física contra a pepsina do lúmen que atinge a sub-camada do epitélio. O papel da secreção de HCO_3^- é de neutralizar o ácido difundido na camada de gel da mucosa e manter o pH próximo da neutralidade na interface da superfície da mucosa e do muco (49).

Vários autores (49, 50) concluíram que a estimulação da secreção ácida aumenta a habilidade da mucosa gástrica em resistir às lesões. As células parietais quando liberam o íon H^+ , simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através

da troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que resulta numa maior disponibilidade de bicarbonato. Além disso, para cada íon H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, provocando o que se conhece como *maré alcalina* após a secreção de ácido gástrico. O papel da *maré alcalina* em proteger a mucosa gástrica é fortemente sustentado por outros estudos demonstrando que a administração parenteral de bicarbonato *in vivo*, e a infusão de bicarbonato na mucosa gástrica *in vitro* protegem a mucosa contra lesões.

Estudos recentes (40, 43, 51, 52) demonstraram que a existência de substâncias sulfidríla na mucosa tem envolvimento direto com o mecanismo de citoproteção gástrica. O modelo de úlcera por etanol tem sido o mais sugerido para determinar este envolvimento, pelo fato do etanol participar diretamente do bloqueio das substâncias protetoras da mucosa gástrica, resultando numa agressão direta à mucosa.

Para avaliar a participação de substâncias sulfidríla na citoproteção gástrica, animais são tratados previamente com N-etilmaleimida (NEM), que é um composto que promove alquilação dos grupamentos sulfidríla, presentes na mucosa gástrica, inativando-os (43).

Outro mecanismo também pode avaliar a participação das substâncias sulfidríla, através de inibidores da síntese da glutatona. A utilização de sulfoximina de butionina (BSO), um inibidor da enzima γ -glutamilcisteína-sintetase, que promove a síntese da glutatona, mostrou que o bloqueio desta enzima, induz severos danos na mucosa gástrica (53, 54).

Proteção epitelial. As células epiteliais gástricas têm propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica (34).

Aspectos anatômicos da gastroproteção epitelial. O mecanismo de proteção de órgãos complexos, como o estômago, é influenciado por sua composição e estruturas histológicas e anatômicas. Esta proteção pode ser ativada por pelo menos 2 mecanismos: preservando as células existentes ou repondo o tecido lesionado (34).

➤ **Hidrofobicidade da mucosa gástrica e junções intercelulares:** As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Agentes que conseguem atravessar estas junções ainda podem ser barrados pela membrana celular das células gástricas, que são compostas por elevada concentração de fosfolipídios, restringindo a difusão de moléculas hidrofílicas, como o íon H^+ (34, 46).

➤ **Divisão e migração celular:** Quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre a morte celular, as células necrozadas podem ser repostas pela migração das células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou pela divisão das células do colo glandular que migram até o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (34, 36).

O fator de crescimento epidermal (EGF) acelera a cicatrização das úlceras por estimular a proliferação e a migração celular, modular o fluxo sanguíneo, assim como por inibir a secreção de ácido e pepsinas (55, 57).

Recentemente foi demonstrado que a regulação da migração celular também pode ser estimulada pelo fator de crescimento de hepatócito, que também é sintetizado em células gástricas. Além disso, já foi observado o envolvimento da ciclooxigenase induzida (COX-2) na resposta proliferativa das células gástricas induzidas por fator de crescimento, sugerindo mais um mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das prostaglandinas (56, 57).

Aspectos bioquímicos da gastroproteção epitelial.

➤ **Sistema antioxidante:** As espécies reativas do oxigênio (ERO) são geradas constantemente nas células durante alguns processos, como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), durante o metabolismo de xenobióticos e durante a resposta inflamatória. As ERO, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são moléculas altamente reativas que interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais, como o DNA, as proteínas e lipídios. Assim, defesas celulares antioxidantes são necessárias para manter a homeostase celular (58).

O estresse oxidativo pode ser prevenido tanto por ação enzimática quanto por defesas antioxidantes químicas. As enzimas que promovem a primeira linha de defesa contra o O_2^- e o H_2O_2 incluem a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (58).

A SOD remove o O_2^- do ambiente celular pela conversão em H_2O_2 , que é metabolizado pela CAT em oxigênio e água (25); ou ainda, o H_2O_2 pode ser reduzido pela GPx, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como substrato (59). Segunda linha de defesa antioxidante é realizada por alguns compostos de reduzida massa molecular, incluindo

vitaminas, flavonóides da dieta, carotenóides, ácido úrico e a GSH (58). A GSH atua como um varredor de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas com o alimento ou produzidas diretamente no trato gastrointestinal (60). Sob condições de estresse oxidativo, a GSH reduz as espécies reativas do oxigênio, sendo liberada na forma oxidada (GSSG). O aumento de GSSG durante o estresse oxidativo geralmente é transitório, pois é reduzida rapidamente pela glutatona redutase (GR) (59).

A conjugação não-enzimática do GSH com compostos eletrofílicos ocorre apenas quando o eletrófilo é muito reativo. Desta forma, a conjugação é favorecida pela ação da enzima glutatona S-transferase (GST) (59).

A GST possui a habilidade de conjugar diversos substratos com a GSH devido à natureza relativamente não específica do sítio de ligação para o substrato hidrofóbico e pela existência de inúmeras isoformas dessa enzima. Esta enzima é capaz de desintoxicar compostos endógenos lesivos, como xenobióticos eletrofílicos e/ou intermediários reativos formados durante sua biotransformação (58).

Foi proposto (61) outro papel antioxidante da GSH, que depende da sua habilidade em reagir com o radical centralizado de carbono ($R^\cdot$). Nesta hipótese, a GSH atuaria em conjunto com a SOD para prevenir o dano oxidativo.

A enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1) também protege as células contra o estresse oxidativo (62). A NQO1 é uma enzima antioxidante que catalisa a redução de dois elétrons de quinonas (endógenas e exógenas) formando hidroquinonas, sem que haja a produção de espécies reativas do oxigênio, auxiliando na proteção da membrana celular contra os danos oxidativos (63).

➤ **Óxido nítrico:** O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gerada, através de uma série de etapas de transferência de elétrons, por uma família de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS). Três genes independentes codificam as NOS neuronal (nNOS), a eNOS endotelial e a induzida (iNOS) (64), as quais possuem a capacidade de gerar o NO por mecanismos regulatórios complementares e distintos. O NO, por sua natureza lipofílica, difunde-se rapidamente, iniciando sinais intercelulares e intracelulares (65). A via melhor caracterizada da sinalização produzida pelo NO está relacionada com a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), onde o NO liga-se no grupamento heme da enzima,

estimulando a formação de GMPc, que por sua vez ativa proteínas quinases G (PKG), iniciando uma cascata de fosforilação para obter a função efetora (66).

Entretanto, em condições fisiopatológicas e provavelmente durante certas condições fisiológicas, a sinalização mediada por NO pode ser independente da ativação da GC. O NO, por exemplo, regula diretamente a função de canais iônicos, enzimas e várias proteínas. Esta regulação parece ser, ao menos em parte, controlada pela nitrosilação de grupamentos tióis do resíduo de cisteína presentes nas proteínas (67).

Mais recentemente, o óxido nítrico tem sido reconhecido como um mediador fundamental nos mecanismos de defesa gástrica. Em vários estudos, foram demonstrados que as lesões na mucosa gástrica induzidas por agentes químicos são reduzidas pela administração de NO e agravadas com a sua remoção (68, 69). Este efeito pode estar ocorrendo devido ao aumento do fluxo sanguíneo da mucosa promovido pelo NO (13) ou ainda por promover um aumento na liberação de muco gástrico (70).

Recentemente também foi demonstrado que a administração de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) inibidor da NOS acentua as lesões gástricas induzidas por etanol e aumenta a atividade da H⁺,K⁺-ATPase, enquanto doadores de NO (nitroprussiato) reparam as lesões induzidas por etanol e inibem a atividade ATPásica em ratos (71).

Vários estudos trazem informações contraditórias a respeito do papel do NO no trato gastrointestinal. Takeuchi et al (72) demonstraram que o NO inibe a secreção duodenal de bicarbonato. Por outro lado, outros pesquisadores sugeriram que a secreção de bicarbonato é estimulada por NO (73).

Também foram realizados estudos para avaliar a participação do NO na motilidade gastrointestinal e no fluxo sanguíneo gástrico. Enquanto o papel do NO na motilidade gastrointestinal é fortemente controlada pela nNOS, os efeitos nas funções vasculares ocorrem, em maior parte, através da eNOS (74).

Estudos em humanos permitiram observar que inibidores da NOS aumentam a frequência de contrações gástricas e aumentam o esvaziamento gástrico, assim como doadores de NO inibem o esvaziamento gástrico promovendo a acomodação da região proximal do estômago (75).

A maior parte do fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal entra pela vasculatura mesentérica e é regulado, em grande parte, pelas arteríolas. O papel do NO neste processo foi evidenciado por inibidores de NO, que reduziram o fluxo sanguíneo em artérias mesentéricas (76, 77).

O papel do óxido nítrico na secreção ácida gástrica é mostrado por vários estudos com informações contraditórias. Estes estudos têm demonstrado que o NO também interfere na secreção gástrica de ácido. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o NO estimula a secreção ácida gástrica em camundongos (78). No entanto, outros pesquisadores demonstraram que o NO inibe a secreção ácida gástrica em ratos (79) e em glândulas gástricas isoladas de coelhos (102). Estudos em humanos indicaram que o NO pode tanto reduzir quanto aumentar o pH intragástrico (80).

No estudo de Brown et al. (81) demonstrou-se, em células parietais isoladas de rato, que altas doses de um doador de NO inibe a secreção ácida gástrica induzida por histamina, sugerindo que o NO atua diretamente na célula parietal. Kato et al. (79) demonstraram que a administração intragástrica de doadores de NO inibe a secreção ácida induzida por pentagastrina e inibe a liberação luminal de histamina em ratos anestesiados. Os autores sugerem que a inibição da secreção ácida por NO ocorre pela redução da liberação de histamina pelas células do tipo enterocromafinas.

Outros estudos demonstraram que doadores de NO, em altas doses, inibem a secreção ácida induzida por histamina, em estômagos isolados de camundongo, por betanecol e por estimulação vagal. Entretanto, estes mesmos autores (78, 82) observaram um aumento da secreção ácida gástrica e um aumento da liberação de histamina quando utilizaram baixas doses do doador de NO.

Segundo Hasebe et al. (82), esta discrepância do NO em inibir ou estimular a secreção ácida gástrica pode ser explicada pela hipótese de que a concentração de NO é quem determina se vai ocorrer uma estimulação ou inibição. Sugeriu-se que baixas concentrações de NO possuem um efeito estimulatório no conteúdo celular de histamina, aumentando a secreção ácida gástrica, enquanto uma alta concentração de NO teria um efeito inibitório nas células parietais, inibindo a secreção ácida gástrica.

Proteção sub-epitelial

- **Microcirculação gástrica:** O fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato. Quando o ácido gástrico ou outro agente irritante invade o compartimento subepitelial, neurônios sensoriais aferentes são capazes de disparar um rápido aumento no fluxo sanguíneo da mucosa que permite o tamponamento do ácido e uma rápida remoção de substâncias tóxicas, limitando, desta forma, sua penetração em camadas mais profundas da mucosa (36).
- **Tônus muscular:** A modulação do esvaziamento gástrico, da motilidade duodenal e da mistura ácido-base representa mecanismos de defesa gástrica. Os vasos sanguíneos gástricos atravessam a *muscularis mucosae* tanto perpendicularmente quanto obliquamente. Assim, a contração do músculo liso da parede gástrica comprime os pequenos vasos, favorecendo a lesão endotelial e o desenvolvimento de congestão e estase local por drogas como o etanol (83).
- **Resposta inflamatória aguda:** Quando os níveis superficiais da defesa da mucosa falham ou são vencidos por uma lesão luminal, o próximo nível de defesa da mucosa é a resposta inflamatória aguda. Resumidamente, os neutrófilos migram da circulação para o local da lesão para facilitar o reparo e reduzir a entrada de microorganismos na circulação sistêmica (84).

Secreção ácida gástrica

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido. O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas, a absorção de ferro, cálcio, vitamina B12, e previne o crescimento bacteriano e a infecção entérica. Entretanto, quando os níveis de ácido e pepsina se sobrepõem aos mecanismos de defesa da mucosa, há a formação de úlceras. Para prevenir estas lesões, a secreção ácida gástrica pode ser precisamente regulada. A regulação envolve vias aferentes e eferentes do sistema nervoso central e entérico, assim como a atuação de células neuroendócrinas e imunes pelas vias autócrina, parácrina, e hormonal (77).

As vias regulatórias convergem em 4 células cruciais para a secreção ácida: (a) as células parietais da mucosa oxíntica (corpo e fundo gástrico), que produzem ácido clorídrico; (b) as células do tipo enterocromafinas (ECL) da mucosa oxíntica, que produzem a histamina

(principal estimulante parácrino da secreção ácida); (c) as células G da mucosa antral, que produzem a gastrina (principal estimulante hormonal da secreção ácida); e (d) as células D da mucosa oxíntica e antral, que produzem a somatostatina (principal inibidor parácrino da secreção ácida) (77).

Mecanismos centrais

A fase cefálica da secreção ácida é ativada por sinais sensoriais reconhecidos pelo cheiro, pelo paladar, pela visão e pelo pensamento nos alimentos, que contribui em aproximadamente 50% para a resposta da secreção ácida durante a alimentação. O núcleo dorsal motor do vago (na medula) e o núcleo paraventricular (PVN) (no hipotálamo) são responsáveis pela integração das informações aferentes e eferentes. O PVN é conectado anatomicamente e funcionalmente com o núcleo arqueado (ARC). O neuropeptídeo Y e os neurônios contendo o fator liberador de corticotropina (CRF) estão presentes no ARC e no PVN e inibem a secreção ácida. Existe a hipótese de que o neuropeptídeo Y, liberado das projeções de neurônios do ARC para o PVN, ativa os neurônios do CRF nesta região do cérebro (77, 85).

A neuromedina U também está presente no ARC e, quando administrada por injeção intracerebroventricular, inibe a secreção ácida gástrica (86). Este efeito é mediado por CRF, pois foi observado que anticorpos para CRF podem bloquear o efeito. O CRF, por sua vez, ativa os neurônios simpáticos noradrenérgicos (77).

A capsaicina é capaz de se ligar aos receptores vanilóides (VR1), que já foram localizados nos terminais aferentes vagais, assim como no núcleo do trato solitário e na área postrema (87). A injeção intracerebroventricular de capsaicina estimula a secreção ácida gástrica em ratos, sendo que esta resposta envolve os receptores VR1 e a liberação de taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), pois este efeito pode ser bloqueado por antagonista VR1, antagonista NK-2 da taquicininina, ou por antagonista CGRP (88). Estes estudos sugerem que as fibras vagais aferentes podem estar envolvidas na transmissão do estímulo doloroso, e talvez em todo o estímulo fisiológico do estômago para o sistema nervoso central (88, 89). O sistema nervoso central interpreta estes sinais e transmite a informação eferente pelo nervo vago, que possui um gradiente de inervação decrescente. A

influência vagal é máxima no estômago e no duodeno proximal, diminuindo na porção mediana e final do intestino (90).

Mecanismos periféricos

Estimulantes da secreção ácida

➤ **Gastrina:** A gastrina e a colicistocinina (CCK) possuem a sequência pentapeptídica carboxi-terminal idênticas. Existem duas classes de receptores para gastrina/CCK caracterizadas: CCK-1 (ou CCK-A) e CCK-2 (ou CCK-B). Os receptores CCK-1 são específicos para CCK, enquanto os receptores CCK-2 reconhecem tanto a CCK quanto a gastrina (Figura 1) (77).

A gastrina é o principal mediador da secreção ácida estimulada por alimento. Sua estimulação ocorre diretamente via receptores CCK-2 na célula parietal e, principalmente, indiretamente pelos receptores CCK-2 nas células ECL (Figura 1). As células ECL liberam histamina que estimulam a secreção ácida ativando os receptores H-2 presentes nas células parietais (77).

Durante o jejum, ocorre uma via de *feedback* envolvendo a secreção de somatostatina para atenuar a secreção ácida. O ácido luminal estimula a secreção de somatostatina antral que, por sua vez, inibe a secreção de gastrina. Quando a secreção de ácido é reduzida por drogas ou pela gastrite atrófica, a secreção de somatostatina é diminuída, e consequentemente a secreção de gastrina é estimulada, resultando na hipergastrinemia (77).

Após a alimentação, nutrientes da dieta estimulam células duodenais a liberar CCK, que interagem com receptores CCK-1 presentes nas células D da mucosa antral e oxíntica e com receptores CCK-2 presentes nas células ECL e parietal. O efeito da ativação do receptor CCK-1 predomina. Assim, o efeito da colicistocinina, fisiologicamente, é a inibição da secreção ácida (Figura 1) (77).

Histamina: No estômago, a histamina é estocada em maior quantidade nas células ECL localizadas na terceira porção inferior da glândula oxíntica (91). É armazenada em vesículas secretoras, sendo liberada após estimulação por gastrina, pelo fator de transformação do crescimento-alfa (TGF- α), pelo peptídeo intestinal vasoativo, e pelo peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (92).

A gastrina liga-se ao receptor CCK-2 da célula ECL promovendo um aumento de Ca^{+2} intracelular. O aumento de Ca^{+2} promove a exocitose e a histamina é liberada. O TGF- α liga-se no receptor do fator de crescimento nas células ECL, e o peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (membro da família do peptídeo intestinal vasoativo) está presente nos neurônios da mucosa gástrica e liga-se no receptor PAC1 nas células ECL. A gastrina, o TGF- α e o peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária estimulam a transcrição e a atividade da histidina descarboxilase (enzima que descarboxiliza a histamina) (93, 94). A histamina liberada se difunde para as células parietais vizinhas e estimula a secreção de ácido pela ligação com os receptores H-2 expressos na superfície da célula parietal (77).

Acetilcolina: A acetilcolina (ACh), liberada dos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso entérico, estimula diretamente a secreção de ácido através da ativação dos receptores M-3 nas células parietais. Hirschowitz e Molina (95) demonstraram que receptores do tipo M1 presentes nas células do tipo enterocromafinas (ECL), quando bloqueados por antagonista específico M1, inibem a liberação de histamina, reduzindo a secreção ácida gástrica.

➤ **Grelina:** A grelina é abundantemente expressa em células da mucosa oxíntica. Em humanos, a infusão de grelina aumenta o apetite, o consumo de alimentos e a secreção ácida gástrica. Ela é liberada durante o jejum e é inibida pela administração intragástrica de proteínas, carboidratos ou lipídios, pela CCK, pela somatostatina, e pela infecção por *Helicobacter pylori* (96, 97, 98).

Inibidores da secreção ácida

Somatostatina: A somatostatina, presente nas células D da mucosa antral e oxíntica, inibe a secreção ácida por atuar diretamente nas células parietais e indiretamente por inibir a secreção de histamina (das células ECL) e a secreção de gastrina (das células G). As ações da somatostatina são mediadas via 5 subtipos de receptores acoplados à proteína G, conhecidos como SSTR1 a SSTR5. Estudos farmacológicos e moleculares, incluindo estudos em camundongos *knockout*, sugerem que o SSTR2 é o receptor que está mais envolvido com a regulação da secreção ácida gástrica. Embora a secreção ácida gástrica nos camundongos *knockout* seja 10 vezes mais elevada que a secreção ácida dos camundongos

selvagens, não há nenhuma alteração nos níveis circulantes de gastrina, sugerindo que a inibição da gastrina pela somatostatina pode não envolver o receptor SSTR2 (99).

Além disso, foram identificados receptores SSTR2 em células parietais e ECL, mas não nas células secretoras de gastrina (99).

Peptídio relacionado ao gene de calcitonina/adrenomedulina: O peptídio relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) pertence a uma família de neuropeptídeos que incluem a calcitonina, a adrenomedulina e a amilina. No estômago, a adrenomedulina está presente nas células ECL e o CGRP nos neurônios sensoriais extrínsecos. Seus receptores já foram identificados em células D nas glândulas da mucosa antral e oxíntica (100). Ambos CGRP e adrenomedulina estimulam a secreção gástrica de somatostatina e inibem a secreção de histamina, inibindo a secreção ácida gástrica (101). A amilina está co-localizada com a somatostatina nas células endócrinas do fundo gástrico. Em estômagos de ratos e camundongos, a amilina liberada das células D, por via autócrina, interage com receptores de amilina, aumentando a secreção de somatostatina, que consequentemente inibe a secreção de histamina e ácido gástrico (102).

➤ **Prostaglandinas:** As prostaglandinas (PGs) são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, através das enzimas ciclooxigenases (COX). Enquanto a isoforma COX-1 (constitutiva) produz a maior parte de prostaglandinas (PGs) no estômago normal, a COX-2 (induzida) atua como um fator importante na cicatrização das úlceras. Inicialmente acreditou-se que a COX-2 contribuía para a cicatrização das úlceras unicamente através da produção de PGs. Entretanto, estudos recentes sugerem que a inibição da COX-2 aumenta o tempo de cicatrização das úlceras tanto por via dependente quanto independente de prostaglandinas (74). Segundo Wallace (84), em pacientes com úlceras pré-existent, tem-se sugerido utilizar derivados de antiinflamatórios não esteroidais que liberam NO ao invés de inibidores seletivos de COX-2, pois estes não interferem na cicatrização das úlceras e, em alguns casos, podem acelerar sua cicatrização.

As prostaglandinas, especialmente a PGE₂, possuem efeitos citoprotetores na mucosa gástrica como consequência de vários mecanismos indiretos, como o aumento da produção de muco e bicarbonato que recobrem as células epiteliais, a inibição da motilidade gástrica, a inibição da secreção ácida gástrica, a manutenção do fluxo sanguíneo gástrico, a inibição

da apoptose, a inibição da ativação de mastócitos, e a diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular (76).

As prostaglandinas (PGs) inibem a secreção de ácido por ação direta na célula parietal ou indiretamente pela inibição da liberação de gastrina. Nas células parietais, as PGs modulam a secreção ácida por inibir o aumento de AMPc induzido por histamina (76).

Mecanismos intracelulares

A interação com os receptores M-3 na célula parietal, ativa canais de cálcio operados por receptores, produzindo um influxo de cálcio. Além disso, os receptores M-3 e CCK-2 presentes na membrana da célula parietal estão acoplados a fosfolipases que catalisam a ruptura dos fosfolípidios de membrana, formando o inositol trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3 mobiliza o cálcio intra e extracelular, elevando sua concentração em até 10000 vezes. O cálcio pode se ligar a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (CaM), que ativa as proteínas quinases cálcio dependentes (PKC). O DAG permanece fixo à membrana plasmática e atua como cofator, junto com o cálcio, na ativação da PKC (103, 104).

O receptor H-2 presente na célula parietal é acoplado ao sistema adenilato ciclase via proteína G. A adenilato ciclase estimulada converte a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (AMPc). A AMPc formado ativa as proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA). A estimulação da célula parietal pela histamina também produz um aumento de cálcio intracelular transitório, podendo esclarecer porque os antagonistas de receptor H-2 podem inibir parcialmente a secreção ácida estimulada por agentes colinérgicos (103, 105).

A ativação da PKC pelas vias colinérgicas (M-3) e endócrina (CCK-2) ou a ativação da PKA pela via histaminérgica (H-2) faz com que proteínas quinases fosforilem as proteínas responsáveis pela ativação da bomba H^+/K^+ -ATPase (104).

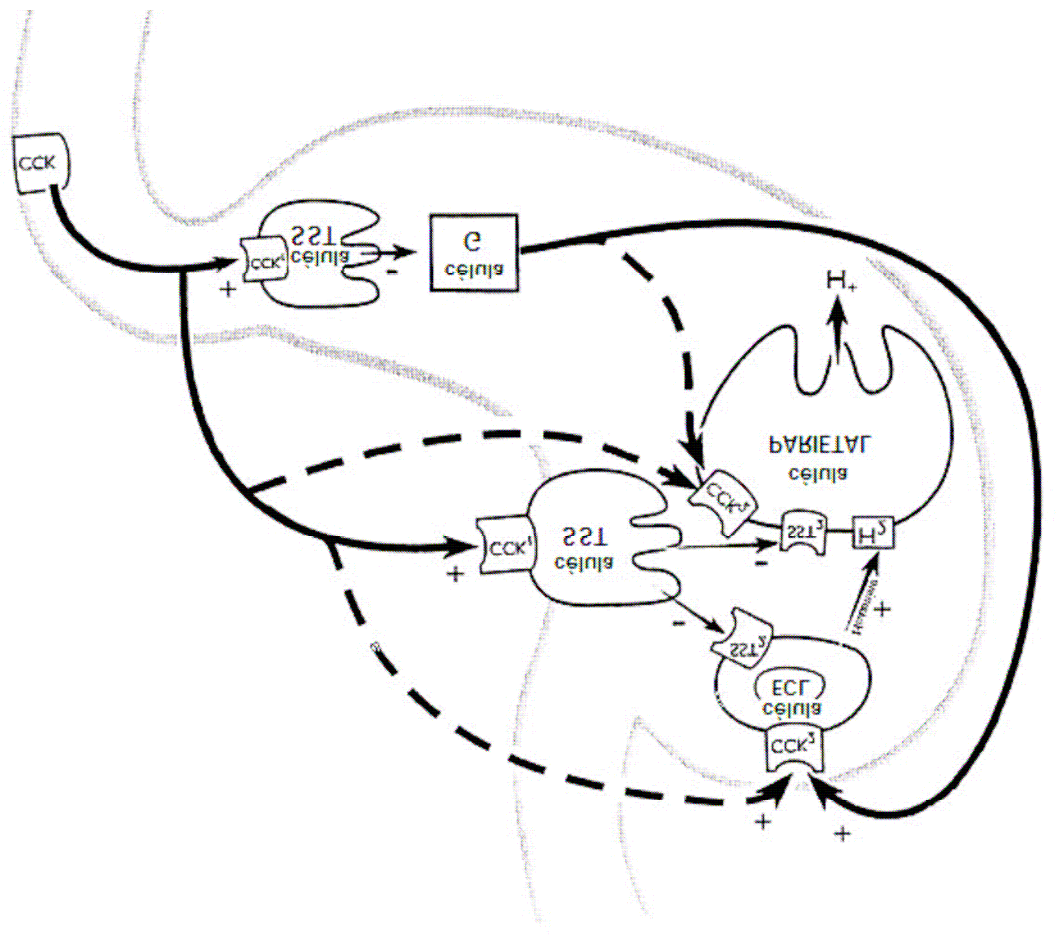


Figura 1.: Modelo ilustrando a regulação da secreção ácida gástrica hormonal e parácrina, esclarecendo as funções dos receptores de colicistocinina (CCK-1 e CCK-2). A gastrina estimula a secreção ácida gástrica diretamente na célula parietal via receptores CCK-2 e, indiretamente pela ligação aos receptores CCK-2 nas células ECL, estimulando a secreção de histamina. A colicistocinina (CCK), liberada de células duodenais em resposta aos nutrientes da dieta, interage tanto com o receptor CCK-1 nas células D antrais e oxínticas para a liberação de somatostatina, como com o receptor CCK-2 das células ECL e parietais. O efeito da ativação do receptor CCK-1 predomina. Assim, o efeito da colicistocinina, fisiologicamente, é a inibição da secreção ácida. (H2 – receptor H2 de histamina; SST2 – receptor de somatostatina do tipo 2; CCK – colicistocinina; CCK-1 – receptor de colicistocinina do tipo 1; CCK-2 – receptor de colicistocinina do tipo 2) (Figura adaptada de ref.77).

➤ **H⁺,K⁺-ATPase:** A H⁺K⁺-ATPase é uma bomba de prótons responsável pela secreção ácida gástrica. A subunidade responsável pela troca de H⁺ por K⁺ à custa de ATP, possui 10 segmentos transmembrana. A subunidade é uma glicoproteína com sua maior parte no espaço extracelular. Esta subunidade contém oligossacarídeos, 6 resíduos de cisteína com 3 pontes dissulfeto, e dobras protéicas intrínsecas que são essenciais para a estabilidade estrutural e funcional da H⁺K⁺-ATPase (106). As H⁺K⁺-ATPases são estocadas em tubulovesículas citoplasmáticas nas células parietais.

Quando ocorre um estímulo, as tubulovesículas se fundem com a membrana apical e a H⁺K⁺-ATPase se torna ativa para secretar o ácido. Quando o estímulo é cessado, as bombas são recicladas e voltam para o compartimento citoplasmático.

Os inibidores da bomba de prótons produzem seu efeito por ligar-se apenas nas bombas inseridas na membrana apical (77, 90).

Processo de regeneração tecidual

➤ **Resposta inflamatória**

Alguns agentes, incluindo os ácidos fracos não ionizáveis em etanol, danificam a mucosa gástrica e causam aumento expressivo no desaparecimento do ácido do lúmen gástrico. Estudos demonstraram evidências da relação do HCO₃⁻ intersticial e plasmático neutralizante do ácido intraluminal, com a mucosa danificada por injúrias. Esta relação deve ser distinguida do metabolismo dependente do transporte de HCO₃⁻ da mucosa não injuriada, mas foi determinada a importância do reparo da mucosa pela manutenção do pH neutro abaixo da mucosa e acima do epitélio. Esta camada entre a mucosa e o epitélio tem ação protetora primeiramente devido a uma espessa camada de gel de fibrina ligando o fibrinogênio plasmático com o HCO₃⁻ intersticial e que é distinta do muco gel aderente que cobre a mucosa não danificada (49).

Um dos eventos celulares mais importantes no começo do processo inflamatório é a migração de um grande número de neutrófilos no local inflamado. Os neutrófilos em granulação amplificam a resposta imunológica pela clivagem enzimática de proteínas da matriz extracelular. A remoção dos neutrófilos do local inflamado envolve apoptose e reconhecimento pelos macrófagos. Essa remoção de células sem liberação dos conteúdos de granulação é necessária para cessar a inflamação. Ativação da apoptose nos neutrófilos

pode levar a limitação do tecido injuriado associado com inflamação e pode ser muito útil para o tratamento de doenças crônicas inflamatórias como artrite reumatóide (107).

REFERÊNCIAS

1. Walzem RL. Health enhancing properties of whey proteins and fractions. Usdec/ Applications Monograph, 1999; 108.
2. US Dairy Export Council NEWS INGREDIENTS. 2001, 3(3):2. <http://www.usdec.org/files/Publications/>
3. US Dairy Export Council NEWS INGREDIENTS. 2000; 3(2):5. <http://www.usdec.org/files/Publications/>
4. McIntosh GH, Royle PJ, Le Leu RK, Rogester GO, Johnson MA, Grinsted RL, Kenward RS, Smithers GW. Whey protein as functional food ingredients? International Dairy Journal, Barking. 1998; 8(5-6):425-434.
5. Fonseca LM, Fonseca CSP, Brandão SCC. Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite. Indústria de laticínios, Porto Alegre. 1999; 4(21):6-9.
6. Borges PFZ, Sgarbieri VC, Jacobucci HB, Pacheco MTB, Baldini VLS. Produção piloto de proteína de leite bovino: composição e valor nutritivo. Brazilian Journal Food Technology, Campinas. 2001;4(52):1-8.
7. Baruchel S, Viau G, Olivier R, Bounous G, Wainberg MA. Nutraceutical modulation of glutathione with a humanized native milk serum protein isolate, Immunocal TM: application in AIDS and câncer. In: Montagner L, Olivier R, Pasquier C. Oxidative stress in câncer, AIDS and neurodegenerative diseases. New York: Marcel Dekker, 1998. cap.42:447-462.
8. Bounous G, Kongshavn PAL. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. Journal of Nutrition. 1985, 115:1403-1408.
9. Bounous G, Gervais F, Amer V, Batist G, Gold P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and diseases of aging. Clinical Investigative Medicine. 1989a, 12:343-349.
10. Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey protein: role of glutathione. Clinical Investigative Medicine. 1991, 14(4):296-309.
11. Bounous G, Baruchel S, Falutz J, Gold P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. Clinical Investigative Medicine. 1993, 16(3):204-209.

12. Kennedy RS, Konok GP, Bounous G, Baruchel S, Lee TDG. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study. *Anticancer Research*. 1995, 15(6B): 2643-2650.
13. Brink W. The wonders of whey. Life extension report. 1999; May:35-38 [citado em 2002 Jan 31]; Disponível em: http://www.lef.org/magazine/mag99/mag99_5.html
14. Sgarbieri VC. Proteínas e peptídeos com propriedades funcionais fisiológicas. In: Simpósio Alimentos Funcionais para o Novo Milênio: qualidade de vida e saúde. 2000, Campinas. In: Anais Campinas: UNICAMP; 2000:14-15.
15. Rosaneli CF, Bighetti AE, Antonio MA, Carvalho JE, Sgarbieri VC. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. *J. Medicinal Food*. 2002; 5(4):225-232.
16. Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H. New biological function of bovine α -lactoalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Bioscience Biotechnology Biochemical*. 2001, 65:1104-1111.
17. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacology Therapeutics*. 1999, 51(2):155-194.
18. Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry- glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophysical research Communications*. 1998, 242(1):1-9.
19. Bounous G. The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate. *Immunotec Research*. 1997:1-16.
20. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological interaction*. 1998; 111-112:1-14.
21. Rosaneli CF. Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos. [dissertação de mestrado do departamento de ciência da nutrição]. Campinas:, Unicamp,2002.
22. Mezzaroba LFH, Carvalho JE, Ponezi NA, Antônio MA, Monteiro KM, Possenti A, Sgarbieri VC. Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*. 2006;16:1005-1012.

23. Santos, CDI. Ação do colágeno extraído de tendões bovinos (colágeno tipo I) na recuperação de lesões da mucosa duodena induzidas por lectinas de feijão (*Phaseolus Vulgaris*). [dissertação de mestrado do departamento de ciência da nutrição]. Campinas: Unicamp,1992.
24. Guyton AC, Hall JE. Fisiologia Médica. vol 1:668-717, 10^a Ed., Guanabara Koogan S.A; Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
25. Lucey MR, Yamada T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Dig. Dis. Sci.* 1989; 34:5S-13S.
26. Chuang CN, Chen MCY,Soll AH. Gastrin-histamine interections: direct and paracrine elements. *Scand. J. Gastroenterol.*1991;26:95-103.
27. Sundler F, Ekblad E, Hakanson R. The neuroendocrine system of the gut – an update. *Acta Onco.*1991;30:419-27.
28. Schubert ML, Shamburek RD. Control of acid secretion.*Gastroenterology Clinics of America.* 1990;19:1-25.
29. Costa M, Brookes SJH. The enteric nervous system. *American Journal of Gastroenterology.* 1994;89:S129-S137.
30. Milani S, Calabrò A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microscopy Research and Technique.* 2001;53:360-71.
31. Al Moutaery AR, Tariq M. Effect of quinacrine, a phospholipase A2 inhibitor on stress and chemically induced gastroduodenal ulcers. *Digestion.* 1997, 58:129-137.
32. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* 4^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
33. Abitbol RA. Doença ulcerosa péptica. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em:<http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>.
34. Szabo S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *Journal of Clinical Gastroenterology.* 1991;13:21S-34S.
35. Glavin GB, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *Faseb. Journal.*1992;6:825-831.

36. Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb. Journal*.1996;10:731 - 740.
37. Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*. 2000, 47: 589-594.
38. Bighetti AE. Atividade antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip. Campinas, 100p. [dissertação de mestrado em farmacologia faculdade de ciências médicas]. Campinas:UNICAMP, 1999.
39. Robert A. Cytoprotection by prostagladins. *Gastroenterology*. 1979, 77(4):761-767.
40. Szabo S. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*. 1981, 214(4517):201-202.
41. Dias PC. Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semipurificadas de *Artemisia annua* L. Campinas, 85p. [dissertação de mestrado em farmacologia faculdade de ciências médicas]. Campinas. UNICAMP, 1997.
42. Loguercio LC, Taranto D, Beneduce F, Del Vecchio Blanco C, De Vincenteis A, Nardi G, Romano M. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut*. 1993, 34(2):161-165
43. Takeuchi K, Okada M, Niida H, Okabe S. Role of sulfhydryls in mucosa injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989, 248(2):836-841.
44. La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martin Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 71(1-2):42-53.
45. Brunton LL. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamentos de úlceras pépticas. In: Hardman J. Limbird LE. Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 9ªed. México: Mc Grawhill, cap. 37, p.663-674,1996.
46. Flemström G, Isenberg JJ. Gastroduodenal Mucosal Alkaline Secretion and Mucosal Protection. *News Physiol. Sci*.2001;16:23-28.

47. Flemström G, Hällgren A, Nylander O, Engstrand L, Wilander E, Allen A. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*1999; 277:G375-G382.
48. Mojzis J, Hegedusova R, Mirossay L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosa injury in rats. *Physiol. Res.*2000;49: 441-46.
49. Allen A, Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005, 288:C1-C19.
50. Kiviluoto T, Ahonen M, Bäck N, Häppölä O, Mustonen H, Paimela H, Kivilaakso E. The pre-epithelial mucus-HCO₃ layer protects against intracellular acidosis in acid-exposed gastric mucosa. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 1993;264:G57-G63.
51. Loguercio C, Piscopo P, Guerreiro C, De Girolamo V, Disalvo D, Del Vecchio Blanco C. Effect of alcohol abuse and glutathione administration on the circulating levels of glutathione and on antipyrine metabolism in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Laboratory investigation.* 1996, 56(5):441-447.
52. Altomare E, Grattagliano I, Didonna D, Gentile A, Vendemiale G. Gastric and intestinal ethanol toxicity in the rats. Effect of glutathione level and role of alcohol and acetaldehyde metabolism. *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 1998 30(1): 82-90.
53. Yamaguchi N, Yajima N, Ishida M, Shimada T, Hiraishi H. Protection of cultured gastric cells against tert-butyl hydroperoxide by glutathione isopropyl ester. *European Journal of Pharmacology.* 1998, 351(3):363-369.
54. Hultberg B, Anderson A, Isaksson A. Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in Hela cell cultures. *Clinica Chimica Acta.* 1999, 283(1-2):21-32.
55. Orsini B, Calabro A, Milani S, Grappone C, Herbst H, Surrenti C. Localization of epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha receptor in the human gastric mucosa. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*1993; 423(1):57-63.
56. Takahashi M, Ota S, Hata Y. Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach. *J. Clin. Invest.*1996;98: 2604-11.

57. Terano A, Sakata-Horie K, Shimada T, Hiraishi H, Yoshiura K, Yoneda M, Takahashi M, Fujimori T. The role of cellular migration in the repair process of gastric epithelial cells. *Life Sci.* 2001;25 26: 3083-9.
58. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Nortelboer H, Zander J, Bladersen PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2001;10: 141-52.
59. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology.* 2002; 64:1019-26.
60. Shirin H, Pinto JT, Liu LU, Merzianu M, Sordillo EM, Moss SF. *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. *Cancer Lett.* 2001; 26(2): 127-33.
61. Winterbourn CO. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* 1993;14: 85-90.
62. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000;153:83-104. Erratum in: *Toxicology.* 2001;163: 219.
63. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem. Biol. Interact.* 2000; 129: 77-97.
64. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992; 256: 225–28.
65. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327:524– 26.
66. Stamler J, Lamas S, Fang F. Nitrosylation: the prototypic redoxbased signaling mechanism. *Cell.* 2001;106: 675–83.
67. Jaffrey S, Erdjument-Bromage H, Ferris C, Tempst P, Snyder S. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell. Biol.* 2001;3:193-97.

68. Lopez-Belmonte J, Whittle BJ, Moncada S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br. J. Pharmacol.*1993;108: 73-8.
69. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig. Dis. Sci.*1994; 39: 366-73.
70. Brown JF, Hanson PJ, Whittle BJ. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *Eur. J. Pharmacol.*1992; 223: 103-4.
71. Bulut R, Unlucerci Y, Bekpinar S, Kuntsal L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺ -ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanolinduced injury in rats. *Dig. Dis. Sci.*1999; 7: 1417-22.
72. Takeuchi K, Ohuchi T, Miyake H, Niki S, Okabe S. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on duodenal alkaline secretion in anesthetized rats. *European Journal of Pharmacology.*1993; 231: 135-8.
73. Holm M, Johansson B, Pettersson A, Fandriks L. Acid-induced duodenal mucosal nitric oxide output parallels bicarbonate secretion in the anaesthetized pig. *Acta Physiologica Scandinavica.* 1998;162: 461-8.
74. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology.*2004;126:903–13.
75. Tack J, Demedt S, Meulemans A, Schuurkes J, Janssens J. Role of nitric oxide in the gastric accommodation reflex and in meal induced satiety in humans. *Gut.*2002;51:219–24.
76. Shah V, Kamath P, De Groen P. Physiology of the splanchnic circulation. In: Topol E, Lanzer F, eds. *Theory and practice of vascular diseases.* Germany: Springer Verlag. 2002;1688-94.
77. Schubert ML. Gastric Secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.*2004;20:519-20.
78. Hasebe K, Horie S, Yano S, Watanabe K. Stimulatory effects of nitric oxide donors on gastric acid secretion in isolated mouse stomach., *Eur. J. Pharmacol.*2001;420:159-64.
79. Kato S, Kitamura M, Korolkiewicz RP, Takeuchi K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*1998;123:839-46.

80. Hirsch DP, Tiel-Van Buul MM, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Effect of L-NMMA on postprandial transient lower esophageal sphincter relaxations in healthy volunteers. *Dig. Dis. Sci.*2000;45:2069-75.
81. Brown JF, Hanson PJ, Whittle BJR. The nitric oxide donor, Snitroso- N-acetyl-penicillamine, inhibits secretory activity in rat isolated parietal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*1993;195:1354-59.
82. Hasebe K, Horie S, Yano S, Watanabe K. Stimulatory Effects of Nitric Oxide Donors on Histamine Realease in Isolated Rat Gastric Mucosal Cells. *Biol. Pharm. Bull.*2003;26:950-53.
83. Szabo S, Bynum TE. Alternatives to the acid-oriented approach to ulcer disease: does 'cytoprotection' exist in man? A new classification of antiulcer agents. *Scand. J. Gastroenterol.*1988;1:1-6.
84. Wallace JL. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *American Journal of Medicine.* 2001;110(1A):19S-23S.
85. Tebbe JJ, Mronga S, Schäfer MKH. Stimulation of neurons in rat ARC inhibits gastric acid secretion via hypothalamic CRF1/2- and NPY-Y1 receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*2003;285:G1075 G1083.
86. Mondal MS, Date Y, Murakami N. Neuromedin U acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via CRH system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*2003;284:G963–G969.
87. Patterson LM, Zheng HY, Wardm SM. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.*2003;311:277–87.
88. Schicho R, Schemann M, Pabst MA. Capsaicin-sensitive extrinsic afferents are involved in acid-induced activation of distinct myenteric neurons in the rat stomach. *Neurogastroenterol Motil.*2003;15:33–44.
89. Danzer M, Jocic M, Samberger C. Stomach-brain communication by vagal afferents in response to luminal acid backdiffusion, gastrin, and gastric acid secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*2004;286:G403–G411.
90. Schubert ML. Gastric Secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.*2003;19:519-25.

91. Prinz C, Zanner R, Gratzl M. Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Ann. Rev. Physiol.*2003;65:371–82.
92. Zhao CM, Chen D, De La Cour CD. Histamine and histidine decarboxylase are hallmark features of ECL cells but not G cells in rat stomach. *Regul. Pept.*2004;118:61–66.
93. Kazumori H, Ishihara S, Rumi MAK. Transforming growth factor- α directly augments histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*2004;286:G508–G514.
94. McLaughlin JT, Ai WD, Sinclair NF. PACAP and gastrin regulate the histidine decarboxylase promoter via distinct mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*2004;286:G51–G59.
95. Hirschowitz BI, Molina E. Effects of four H₂ histamine antagonists on bethanechol-stimulated acid and pepsin secretion in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*1983;234:1–5.
96. Holst B, Schwartz TW. Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol. Sci.*2004;25:113–17.
97. Shimada M, Date Y, Mondal MS. Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2003; 302:520–25.
98. Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H. *Helicobacter pylori* infection modifies gastric and plasma ghrelin dynamics in Mongolian gerbils. *Gut.*2004;53:187–94.
99. Allen JP, Canty AJ, Schulz S. Identification of cells expressing somatostatin receptor 2 in the gastrointestinal tract of *Sstr2* knockout/*lacZ* knockin mice. *J. Comp. Neurol.*2002;454:329–40.
100. Hagner S, Stahl U, Knoblauch B. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell. Tissue Res.*2004;310:41–50.
101. Hirsch AB, McCuen RW, Arimura A. Adrenomedullin stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in the fundus of the stomach. *Regul. Pept.*2003;110:189–95.
102. Zaki M, Koduru S, McCuen R. Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. *Gastroenterology.*2002;123:247–55.

103. Chew CS. Cholecystokinin, cabachol, gastrin, histamine, and forskolin increase (Ca^{+2}) in gastric. *American Journal of Physiology*.1987;250:814-823.
104. Wilkes JM, Kajimura M, Scott DR, Hersey SJ, Sachs G. Muscarinic responses on gastric parietal cells. *Journal of Membrane Biology*.1991;122:97-110.
105. Ueda S, Okada Y. Acid secretagogues induce Ca^{++} mobilization coupled to K^{+} conductance activation in rat parietal cells in tissue culture. *Biochimica et Biophysica Acta*.1989;1012:254-260.
106. Thangarajah H, Wong A, Chow DC. Gastric H-K-ATPase and acidresistant surface proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*.2002;282:G953–G961.
107. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 2006; 14 (2):133-151.

Alterações Fisiológicas Produzidas pelas Proteínas de Soro de Leite Bovino e Hidrolisados de Colágeno na Tumorigênese.

Physiological Changes Promoted by Whey Protein Isolate and Collagen Hydrolysates in Tumorigenesis

Geórgia A Castro¹, Valdemiro C Sgarbieri¹.

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, SP, Brasil.

Proteínas de Soro de Leite e Hidrolisados de Colágeno na Tumorigênese
Whey Proteins and Collagen Hydrolysates in Tumorigenesis

Resumo

Esta revisão trata dos estudos sobre as proteínas de soro de leite e derivados do colágeno em modelos de câncer e tumorigênese. O efeito em diversos modelos de câncer, principalmente de cólon, foi evidenciado como positivo para as proteínas de soro de leite. Para o colágeno foram encontrados estudos mencionando seu efeito no ciclo celular, e atividade proliferativa, sugerindo um epítipo do colágeno tipo IV que poderia ser responsável pela atividade anti-tumoral. O ciclo celular, a morte programada da célula (apoptose), a via das enzimas caspases, angiogênese e terapias contra o câncer são descritos com o objetivo de melhor compreensão dos estudos posteriormente realizados in vitro e in vivo com células B16F10 utilizando colágeno hidrolisado e um isolado de proteína de soro de leite.

Palavras-chave: soro de leite, colágeno, hidrolisado enzimático, tumorigênese

Summary

This review report on studies with whey proteins and collagen protein derivatives in cancer and tumor models. The effect in various cancer models, mainly in colon cancer, was verified as positive for whey proteins. For collagen the studies showed an effect in cell cycle, proliferative activity, suggesting an epitope of collagen type IV responsible for anti-tumoral activity. The cell cycle, programmed cell death (apoptose), caspase route, angiogenesis and therapies against cancer were described in order to better understand the studies conducted latter, both in vitro and in vivo using B16F10 cells evaluating the activity of collagen hydrolysates and a whey protein isolate on these cells.

Key-words: whey protein, collagen, hydrolysates enzymatic, tumorigenesis

INTRODUÇÃO

Tumorigênese

A incidência de câncer, à exceção do câncer de pele, mostra no Brasil taxas por 100.000 pessoas, maior para os estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (197 a 389 habitantes) e menor incidência para o Acre, Pará, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas (50 a 87 habitantes) (INCA, 2006).

A implementação das ações nacionais voltadas para a prevenção e controle do câncer depende diretamente das atividades relacionadas à vigilância que são realizadas com base nas informações obtidas dos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), supervisionadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA/MS), e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde, centralizado nacionalmente pela Secretaria de Vigilância à Saúde – SVS/MS (INCA, 2006).

Cerca de 400 a.C., na Grécia, Hipócrates foi o primeiro a descrever a palavra “carcinos” e “carcinoma” definindo, nessa época, o câncer como uma doença de mau prognóstico (COELHO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.3).

A carcinogênese refere-se ao desenvolvimento de tumores malignos, estudada com base nos fatores e mecanismos a ela relacionados (GUYTON, 2002).

Avanços vêm sendo obtidos na última década nas técnicas da área da biologia e metabolismo molecular e celular. A variação e a exposição a alguns marcadores moleculares e biológicos vêm sendo avaliadas na epidemiologia molecular, bem como no diagnóstico, tratamentos e avaliações clínicas. A suscetibilidade ao câncer depende do metabolismo individual aos compostos carcinogênicos, capacidade de reparo do DNA, alterações nos protooncogenes, genes supressores de tumor e fatores imunológicos (COELHO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.7).

Estima-se que seja necessário a ocorrência de quatro a seis alterações genéticas em diferentes genes para o desenvolvimento de um tumor maligno (KOWALSKI e KOWALSKI, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.55).

O câncer é hoje a segunda causa de morte por doença, com a necessidade de conhecimento sobre sua etiologia, prevenção e tratamento. A grande dificuldade em

discutir o controle do câncer reside na própria natureza multifatorial da doença, em seus reflexos na sociedade e no significado prático da palavra controle. A origem do câncer é simultânea à do próprio indivíduo, estando intensamente relacionada aos seus hábitos de vida, cultura e exposição temporal a fatores ambientais.

Resumidamente, os fatores de risco podem ser de natureza ambiental, ocupacionais, medicamentos, hábitos sexuais, exposição a radiações, ou de natureza constitucional (moleculares, hereditários e suscetibilidade genética). Dentre os fatores de risco relacionados a alimentação temos o alcoolismo (tumor da cavidade bucal e faringe), peixes e alimentos conservados em sal (tumor na nasofaringe), sal e alimentos salgados e apimentados (tumor de estômago), carne e gordura animal (tumor de pâncreas, cólon/ reto, próstata), alimentos contaminados com aflatoxina (tumor de fígado), excessivo consumo de alimentos levando a obesidade (tumor de mama e de rim) (COELHO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.3).

Embora o câncer de pele (carcinoma) seja o tipo de câncer mais freqüente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, quando detectado precocemente este tipo de câncer apresenta altos percentuais de cura. As neoplasias cutâneas estão relacionadas a alguns fatores de risco, como o químico (arsênico), a radiação ionizante, processo irritativo crônico (úlceras de marjolin), genodermatoses (xeroderma pigmentosum etc) e principalmente à exposição aos raios ultravioletas do sol. O câncer de pele é raro em crianças e negros, sendo mais comum nos indivíduos de pele clara, sensível à ação dos raios solares, com doenças cutâneas prévias (INCA, 2006). Somente no Estado de São Paulo, um estudo mostrou que as neoplasias são responsáveis por cerca de 12% dos óbitos registrados na população adulta (COELHO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.3). Os tipos de câncer mais incidentes por ordem decrescente são: de pele, mama feminina, próstata, traquéia/ brônquio e pulmão, estômago, cólon e reto, colo de útero e boca (COELHO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.3).

Como a pele é um tecido heterogêneo, esse tipo de câncer pode apresentar neoplasias de diferentes linhagens. Os tumores malignos do tecido epitelial podem ser de origem de revestimento (carcinoma) e glandular (adenocarcinoma). Os mais freqüentes são: carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, o

carcinoma epidermóide com 25% dos casos e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. Felizmente o carcinoma basocelular, mais freqüente, é também o menos agressivo (INCA, 2006).

O melanoma maligno de pele de acordo com dados do INCA, teve sua maior freqüência em 2006, variando, segundo a Unidade da Federação, de 2,24 a 8,58 para 100.000 indivíduos residentes na região Sul e Sudeste, exceto o estado de Minas Gerais (INCA, 2006).

A integridade de um determinado tecido, assim como a sua função, é conferida por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Esse equilíbrio é mantido por meio de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando esse equilíbrio é perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem um tumor primário. As células tumorais são capazes de se dividir na ausência de sinais positivos para a proliferação e apresentam morfologia e comportamento alterados. No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem por meio da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos. A metástase é definida como o comprometimento à distância, por uma parte do tumor que não guarda relação direta com o foco primário (KOWALSKI e KOWALSKI, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.55; GUYTON et al., 2002).

A perda do controle da proliferação e a aquisição de características associadas com a progressão tumoral são conseqüências de alterações que ocorrem no conteúdo genético das células tumorais (CAMARGO e COSTA, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.71). A célula alterada sofre uma expansão clonal, transmitindo geneticamente a alteração para todas as células, que a partir dela, se originaram. Cada nova alteração é acompanhada de uma nova onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão, um tumor maligno. As alterações genéticas relacionadas ao câncer podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente durante a vida do indivíduo.

No estudo de Klose (KLOSE et al., 2006) foram avaliados tanto os níveis de transcrição da catepsina B, como dos seus inibidores naturais, cistatinas B e C, que foram alterados pela interação das células de melanoma com o colágeno tipo I (KLOSE et al., 2006). A catepsina B é uma cisteína protease lisossomal com atividade exopeptidase. Entretanto, a expressão protéica e localização celular da catepsina B e seus inibidores foram marcadamente afetados. Ao contrário das células de melanoma humano com baixo poder invasivo (SKmel 23, WM164), aquelas com alto poder invasivo (MV3) liberaram procatepsina B quando cultivadas somente em meio de cultura. Também foi observado, que o contato das células invasivas com o colágeno tipo I fibrilar resultou em liberação de ambas as formas maduras de protease. A expressão das proteínas cistatinas B foram significativamente reduzidas nas células com alto poder invasivo em ambas as condições de cultura, quando comparadas com as células de baixo poder invasivo. A expressão da cistatina C foi comparativa em todas as células, mas o contato celular com o colágeno tipo I fibrilar induziu sua expressão. Esses resultados mostram fortemente o papel do contato celular com o colágeno tipo I fibrilar, levando a interações célula-matriz extracelular que regula a atividade da catepsina B em células de melanoma humano (KLOSE et al., 2006).

A responsabilidade do governo em conscientizar a sociedade sobre os métodos preventivos e de controle deve ser tratada com seriedade, a fim de combater a segunda causa de morte por doença, o câncer. A hipotética erradicação total do câncer, utilizando-se medidas preventivas e terapêuticas, significaria um ganho de 2,5 anos na média da expectativa de vida da população norte-americana. Especificamente para os 25% da população que deixaria de ter câncer, a expectativa de vida seria prolongada em 10 a 15 anos (BRENTANI et al., 2003).

Efeito da proteína de soro de leite bovino na tumorigênese

O soro do leite bovino é subproduto da fabricação do queijo, sendo riquíssimo em proteínas e lactose, o que o torna um suplemento alimentar importante. Porém, o soro obtido nessas indústrias não se presta à fabricação de suplementos alimentares, já que o leite é coagulado a altas temperaturas. Este procedimento, que separa a caseína (matéria-prima do queijo) e o soro, tem função bactericida, mas também desnatura as proteínas do soro, que perdem propriedades funcionais importantes (MAUBOIS e OLIVIER, 1997). As

proteínas do soro, principais proteínas do leite podem ser isoladas por meio da manipulação de suas propriedades físicas, seguido do uso de tecnologias específicas de separação. O soro contém uma mistura rica e heterogênea de proteínas com atributos funcionais, podendo ser utilizados para fins nutricionais, biológicos e em alimentos (DIAS, 2004).

A proteína concentrada de soro de leite bovino é obtida a partir do soro do leite pasteurizado e desnatado separado por centrifugação depois da precipitação das caseínas em pH 4,6 e em temperatura de 20°C, e da fase aquosa que é separada do leite pela retração do coágulo enzimático de caseínas, na fabricação de queijo. Os soros obtidos nessas condições são referidos como soros ácido e doce, respectivamente (MARSHALL, 2004). A concentração das proteínas do soro pode ser feita por ultrafiltração, adsorção ou troca iônica, precipitação com polifosfato ou filtração em gel, frequentemente associada com a desmineralização e cristalização da lactose. O soro é separado em duas partes: permeado e retentado. O permeado, composto basicamente de lactose pode ser usado para o isolamento deste dissacarídeo, enquanto que a solução remanescente contém vitaminas e minerais que poderão ser incorporadas em ração animal. O retentado, usado na fabricação do concentrado de proteína de soro de leite bovino, é formado por 85% de proteína e 15% de lactose, de minerais e vitaminas. O retentado passa por uma lavagem com água pura na mesma membrana (diafiltração), para concentrar as proteínas e eliminar ao máximo os outros componentes. O emprego de tecnologias de membranas (ultrafiltração / diafiltração) permite a obtenção de concentrados protéicos de soro de leite com mais de 80% de proteínas, sem que ocorra desnaturação que prejudique as propriedades imunológicas das proteínas mais termolábeis. Depois é desidratado por liofilização e dá origem ao concentrado ou isolado de proteína de soro de leite bovino em pó (MAUBOIS e OLIVIER, 1997).

É extremamente interessante investigar a proteína de soro de leite bovino como alimento e/ou ingrediente funcional, a qual teria impacto na saúde dos indivíduos não somente pelos aspectos nutricionais, mas também através de modulações metabólicas, melhoria na saúde, redução do risco de infecções, doenças degenerativas e crônicas para um aumento de qualidade de vida e longevidade (MCINTOSH et al., 1998; SGARBIERI e PACHECO, 1999; SGARBIERI, 1999a; 1999b).

Existe na literatura evidência de que componentes do leite têm uma importante ação fisiológica inibitória sob determinadas rotas metabólicas. Proteínas de soro de leite bovino estão relacionadas com inibição do crescimento tumoral, inibição de lesões digestivas e efeito anti-hipertensivo (BORNSTEIN e SAGE, 2002).

Estudos sobre alterações na fisiologia promovidas pelas proteínas do leite (soro e caseína) e seus hidrolisados mostram que: concentrado de proteína de soro (WPC) tem a capacidade de reduzir o nível de colesterol hepático e no sangue, em ratos (JACOBUCCI, 1999; JACOBUCCI et al., 2001); WPC e seus hidrolisados inibem lesões ulcerativas causadas por etanol e por indometacina em ratos (ROSANELI, 2002; ROSANELI et al., 2002); estimulam a síntese de glutathione em vários órgãos de ratos e camundongos; inibem o desenvolvimento de câncer de cólon induzido por azoximetano, em ratos; estimulam a produção de anticorpos (IgM) em camundongo após imunização com eritrócitos de carneiro (DIAS, 2004; SGARBIERI et al., 2000); a ingestão de WPC leva ao aumento dos níveis de glutathione e ao aumento da população de linfócitos TCD₄⁺ em crianças infectadas com HIV-1 (MORENO, 2002).

Lactoferrina é uma proteína isolada do leite, com 80 KDa de massa molecular, uma glicoproteína ligante do ferro, que também pode ser encontrada na secreção mamária, lágrimas, saliva e plasma seminal da espécie humana e em vacas. O leite bovino contém aproximadamente 2-20 mg/L de lactoferrina. A lactoferrina endógena tem sido utilizada como marcador de diarreia e inflamação intestinal e também no diagnóstico de câncer e prognóstico do comportamento do tumor. Há vários estudos sobre a investigação gênica de expressão da lactoferrina. Tem sido mostrado que o código gênico da lactoferrina está em uma região que contém vários genes supressores de tumor. O efeito anti-tumoral da lactoferrina e de seus fragmentos ocorre basicamente devido à ação antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-angiogênese, de estimulação imune, anti-proliferativa e de proteção ao tratamento de câncer nos seus diferentes estágios de indução, metástase e terapia. A administração exógena de lactoferrina pode contribuir positivamente no tratamento do câncer (WAARD e BELZEN, 2003).

Estudos com roedores demonstraram que em câncer de cólon a incidência (número de animais com tumor em um determinado grupo de estudo) e multiplicidade (número de

tumores por animal) tumoral reduziu mediante o tratamento com lactoferrina. A dieta com 0,02-2% de lactoferrina inibiu a formação do tumor. Também a lactoferrina inibiu o desenvolvimento do carcinoma de cólon. Os efeitos quimiopreventivos da lactoferrina também foram demonstrados em carcinogênese de pulmão e esôfago. Em adição, esta proteína também inibiu a tumorigênese de língua e bexiga, assim como a metástase em modelos animais. Em outro modelo de células transplantadas, de carcinoma murino houve metástase para o pulmão. Estas células foram transplantadas por via subcutânea nos camundongos e simultaneamente administrando 300mg/Kg/dia de lactoferrina, observando-se uma redução de metástase no pulmão. Também neste mesmo modelo quando a lactoferrina foi administrada por via parenteral (1mg/ animal), também se observou a inibição da metástase. A lactoferrina foi também avaliada em tumor de cólon promovido com azoximetano e o número de criptas aberrantes e a tumorigênese foi inibida. O papel da lactoferrina na tumorigênese contra a formação de tumor e metástase *in vivo* foi verificada em várias formas de administração e modelos (WAARD e BELZEN, 2003).

Alguns estudos mostraram efeito positivo da proteína de soro de leite quanto à atividade anti-tumoral. A resposta imune humoral de camundongos alimentados com 20g de concentrado de proteína do soro de leite bovino por 100g de dieta foi significativamente maior do que de animais alimentados com uma dieta nutricionalmente similar. Após 24 semanas de tratamento com o agente carcinogênico azoximetano, a incidência de tumores nos camundongos alimentados com a proteína de soro foi substancialmente menor comparando com outras dietas. A área tumoral foi menor para os grupos da proteína de soro, mas o ganho de peso corpóreo foi similar ao dos outros grupos estudados. A resposta obtida por PFC (plaque forming cell) em resposta a eritrócitos do sangue de carneiro foi maior também nos grupos alimentados com a proteína de soro após 20 semanas de tratamento com o agente carcinógeno quando comparado com proteína de soja e caseína. A dieta com proteína de soro de leite parece inibir significativamente a incidência e o crescimento tumoral de câncer de cólon provocado por agente carcinogênico. A resposta imunológica e a propriedade inibitória foi bem maior quando comparado com as proteínas de soja e caseína (DIAS, 2004; SGARBIERI et al., 2000).

Uma das teorias citadas a respeito da origem do câncer leva em conta a função protetora exercida pela glutathione (GSH), agindo como antioxidante, desintoxicante e também relacionada à prevenção do câncer. Vários ensaios com animais demonstraram que o concentrado de proteínas de soro exerce efeito anti-carcinogênico. Isso se dá via aumento nas concentrações de GSH nos tecidos, podendo exercer efeito inibidor de tumores menores, via estimulação da imunidade por meio da produção da GSH. A produção de radicais de oxigênio é um passo crítico na carcinogênese e assim, a eliminação desses radicais é importante para a prevenção da doença (CRINNION, 2000; BOUNOUS, 1989 apud MARSHALL, 2004). A atividade antioxidante da proteína do soro é possivelmente devido à contribuição da cisteína (cys) na síntese de GSH (glutathione). A cys tem o grupo tiol (sulfidril) que contribui como agente redutor ativo na prevenção da oxidação e dano tecidual (HOJO, 1986 apud MARSHALL, 2004).

BOUNOUS et al. (1983) discutem o efeito anti-tumoral da proteína de soro de leite em função dos aminoácidos precursores de glutathione, estimulando um aumento do nível de glutathione nos tecidos, uma estimulação imunológica e a desintoxicação de carcinógenos potenciais. Ainda atribuem este efeito da proteína de soro de leite, à sua capacidade ligante ao ferro, o ferro agindo como agente mutagênico causando danos oxidativos aos tecidos.

Muitos estudos com animais apontam em câncer de cólon induzido, que as proteínas de soro reduziram a incidência de tumores e também de criptas aberrantes, quando comparado com proteína de soja o mesmo efeito não é observado. GOODMAN e SCHAMBACHER (1991) demonstraram que lactoferrina tem a habilidade de inibir metástase de tumores primários em camundongos, tendo a albumina do soro bovino (10-15% do total de proteína de soro) uma ação inibitória no crescimento de células de câncer mamário *in vitro*. Estudo em hamster (CLARKE et al., 2002 apud MARSHALL, 2004) demonstrou que frações de soro de leite bovino teve a habilidade de prevenir a mucosite induzida pelo tratamento quimioterápico com 5 Fluoracil. Esta proteção parece ter ocorrido devido ao fator de transformação do crescimento (TGF-beta), o qual reduz a proliferação das células epiteliais basais. Outro estudo *in vitro* feito por KENT et al. (2003) apud MARSHALL (2004) demonstrou que a proteína isolada de soro de leite bovino, quando comparada com a caseína, aumentou a síntese de glutathione e protegeu as células de

próstata humana contra um agente oxidante celular letal. Outro estudo mencionado em (TSAI et al. 2000 apud MARSHALL, 2004) também conduzido *in vitro*, com células humanas hepáticas, foi realizado com proteína de soro de leite com alta concentração de lactoferrina (Immunocal) em comparação com baicaleína e também a combinação dos dois. A baicaleína é uma potente droga anti-câncer, um flavonóide extraído da *Scutellaria revularis*, com alegação de efeito anti-tumoral. O Immunocal administrado sozinho apresentou um impacto significativo nas células hepáticas, entretanto quando este foi combinado com baicaleína ocorreu um efeito citotóxico melhorado devido a indução à alta taxa de apoptose, em comparação ao grupo tratado somente com baicaleína (TSAI et al. 2000 apud MARSHALL, 2004).

Um estudo realizado com 7 pacientes, sendo 5 pacientes com carcinoma metastático de mama, um com câncer pancreático e outro com câncer de fígado, quando receberam 30 g de proteína concentrada de soro de leite bovino (IMMUNOCAL) por 6 meses, observou-se em seis pacientes que a GSH dos linfócitos sanguíneos aumentou inicialmente, sugerindo altos níveis de GSH nos tumores. Após completado o estudo, dois pacientes mostraram sinais de regressão do tumor e os níveis de GSH nos linfócitos normalizaram. Outros dois pacientes mostraram estabilização do tumor, também com níveis normais de GSH. Três pacientes apresentaram progressão do tumor, com altos níveis de GSH. Devido a estes resultados, mais estudos são necessários para conclusões sobre a administração de proteína de soro de leite em conjunto com quimioterápico em humanos (KENNEDY et al., 1995 apud MARSHALL, 2004).

Em um estudo clínico recente, 20 pacientes em estágio IV de malignidade (paciente com câncer de bexiga, 5 de mama, 2 de próstata, 1 neuroblastoma, 1 ovário, 1 gástrico, 3 de cólon, 2 mesotelioma, 2 linfoma, 2 pulmão e 1 osteosarcoma) receberam 40 g/ dia de concentrado de proteína de soro de leite não desnaturada e 50-100 g/dia aplicação intravenosa de Transfer Factor Plus (um suplemento com componentes imunoativos) e 1-2 g/ dia oral de ácido ascórbico, Agaricus blazei tea, um multivitamínico, 500mg *Andrographis paniculata* duas vezes ao dia e um extrato de soja durante seis meses. Após 6 meses, houve 16 sobreviventes, todos com significativo aumento da função das células “natural killer” (NK) e alto nível de hemoglobina e hematócitos. A qualidade de vida destes

pacientes melhorou durante o tratamento, entretanto nenhum estudo foi feito comparativo com um grupo administrando somente soro de leite (SEE et al. 2002 apud MARSHALL, 2004).

O efeito modulador da resposta imune promovido pelas proteínas de soro foi observado em camundongos de várias linhagens com idade aproximada de 7 semanas a 6 meses, alimentados com dietas contendo 20% de proteína com tumores induzidos por azoximetano. O grupo que recebeu soro lácteo apresentou maior resposta imune humoral. Na fase avançada da doença a resposta imune caiu bastante, para todos os grupos. O aumento considerável nos níveis de GSH no cólon, obtido por ingestão de proteína de soro, foi associado à diminuição nos tumores, em experimento em carcinoma humano de cólon, sugerindo que os níveis de GSH modulam a formação do tumor (DIAS, 2004).

A albumina sérica bovina inibiu a produção de estrógenos em meio contendo células humanas de câncer de mama. A adição de proteína de soro de leite em cultura de células cancerosas de próstata e mama apresentou significante redução no crescimento celular, após 24 horas de incubação. A incubação com α -lactalbumina promoveu apoptose seletiva em células de câncer humano. Este efeito foi associado ao alto teor de cisteína nestas proteínas (DIAS, 2004).

O efeito dos derivados de colágeno na tumorigênese

➤ matriz extracelular e colágeno

A capacidade das células malignas destruírem a membrana basal e os demais componentes da matriz extracelular (MEC) tem sido relacionada ao potencial invasivo destas neoplasias (JUHÁSZ, 2000). Pesquisas realizadas utilizando-se de marcadores para os componentes da MEC bem como das enzimas metaloproteinases (MMPs) relacionadas a sua degradação vêm contribuindo para compreensão do comportamento biológico e clínico dos carcinomas de cabeça e pescoço. Nos estudos de Thomas et al.(THOMAS et al., 1999) constam que o aumento na produção dessas enzimas associa-se com o fenótipo metastático e invasivo em muitos tumores e, conseqüentemente, com o comportamento tumoral e prognóstico.

A influência da MEC no comportamento das neoplasias ocorre em vários mecanismos relacionados à proliferação, progressão e invasão tumoral (KOIVISTO, 2000).

Quando carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço encontram-se em desenvolvimento, o tecido adjacente sofre várias alterações como lise do estroma com degradação da MEC, fato este considerado o caminho preparatório para invasão tumoral (THOMAS et al., 1999; RICH e READ, 2001). Adicionalmente, tal estrutura pode ter um papel mais ativo durante a carcinogênese por induzir angiogênese e produção de fatores de crescimento, estimulando dessa forma a proliferação das células neoplásicas (WERNERT, 1997).

Durante o processo de invasão tumoral, as células neoplásicas atravessam dois tipos de matriz (membrana basal e estroma intersticial) e reações bioquímicas entre células normais e a MEC influenciam no processo de invasão tumoral em neoplasia (WILSON, 1999).

De acordo com Miranda (MIRANDA, 2002) os constituintes da MEC contribuem diretamente ou indiretamente ao processo de tumorigênese, pelo fato dessa estrutura conter componentes potencialmente anti-adesivos, moduladores de adesão, proliferação e migração celular. Adicionalmente esses autores relataram que a MEC pode regular o comportamento celular por vários mecanismos: primeiro através da composição de suas proteínas em um determinado tecido e segundo por interações sinérgicas entre fatores de crescimento e moléculas de adesão ou por receptores celulares que mediam a adesão de seus componentes.

Miranda (MIRANDA, 2002) analisou a correlação do padrão de expressão de várias proteínas da MEC, como laminina, colágenos I e IV, fibronectina e tenascina em carcinomas epidermóides de lábio inferior e de língua com gradações histológicas variadas, e observou que o colágeno IV e a laminina estavam ausentes na membrana basal dos ninhos celulares neoplásicos na maioria dos casos estudados e quando presentes a marcação era fraca. A fibronectina esteve imunomarcada em todos os casos estudados e a tenascina expressou-se de forma intensa em membrana basal epitelial, na maioria dos casos estudados, estando presente também no estroma peritumoral, predominando fraca intensidade no lábio e de moderada a forte na língua.

Para o colágeno I, foi observada expressão focal em ambos grupos de carcinomas, com fraca intensidade de reação e padrão predominantemente fibrilar e desorganizado. O autor (MIRANDA, 2002) sugeriu então que os carcinomas epidermóides de língua possuem

maior potencial de invasividade e comportamento mais agressivo quando comparados com os de lábio inferior.

Existem cerca de 15 tipos de colágeno conhecidos (CARVALHO e PIMENTEL, 2001). É a proteína mais estudada, pois é a mais bem distribuída em mamíferos, possui longas cadeias de glicina e prolina que formam uma rígida fita tripla helicoidal. O colágeno formador de fibrilas é o do tipo I (que associados ao do tipo V forma pele, ossos, tendões, ligamentos, tecido frouxo etc), do tipo II (forma a cartilagem hialina e a elástica e pode associar-se com o do tipo XI) e do tipo III (que forma as fibras reticulares). Os colágenos associados às fibrilas são os do tipo IX e XII, que fazem a ligação entre fibrilas e entre outros componentes da matriz. Existem ainda os colágenos formadores de redes, como o do tipo IV, que forma a lâmina basal, e o do tipo VII.

A síntese do colágeno começa nos ribossomos aderidos à membrana, que a partir daí crescem no sentido de entrar no retículo endoplasmático (RE). Forma-se, então, 3 cadeias polipeptídicas, com aminoácidos terminais (pró-peptídios). No RE, a prolina e a lisina sofrem hidroxilação e algumas lisinas são glicosiladas (modificações pós-traducionais). Com isto, há formação do pró-colágeno, auxiliado pelos peptídios de registro. Ao deixar a célula, o procólgeno se transforma em colágeno (CARVALHO e PIMENTEL, 2001).

As moléculas de colágeno são constituídas, em sua maioria, por três cadeias, denominadas α , arranjadas de tal forma que aproximadamente 95% da molécula corresponde a tripla hélice. Geralmente, as extremidades não estão em conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas. Cada cadeia contém repetições de uma sequência característica de aminoácidos, formada por Gly-X-Y, onde X e Y, podem ser qualquer aminoácido, mas X é frequentemente prolina e Y, uma hidroxiprolina. Uma outra característica destas moléculas é que elas podem ser glicosiladas. A glicosilação ocorre nos resíduos de hidroxilisina e é variável de acordo com os tipos de colágeno. Parece haver uma correlação entre glicosilação e diâmetro das fibrilas de colágeno, de forma que quanto maior os pontos de glicosilação, tanto menor o diâmetro das fibrilas de colágeno. A hidroxilação dos resíduos de lisina e prolina é um evento de fundamental importância para a formação das moléculas de colágeno e para o desempenho das suas funções (CARVALHO e PIMENTEL, 2001).

Na pele, colágenos tipos I e III contribuem com 85 a 90% e 8 a 11% do colágeno total sintetizado, respectivamente. O ácido L-ascórbico (AA) é co-fator para duas enzimas essenciais na biossíntese do colágeno. Conseqüentemente, a hidroxilação é uma fase crítica na biossíntese de colágeno, uma vez que regula a formação da tripla hélice, da excreção do procolágeno e das ligações cruzadas do tropocolágeno.

Trabalho recente (MANELA-AZULAY et al. , 2003) demonstrou que, embora a capacidade proliferativa e a síntese de colágeno sejam dependentes da idade, o ácido ascórbico é capaz de estimular a proliferação celular, bem como a síntese de colágeno pelos fibroblastos dérmicos, independente da idade do indivíduo. O AA foi capaz de vencer a capacidade proliferativa reduzida dos fibroblastos dérmicos de indivíduos idosos (78-93 anos), assim como aumentar a síntese de colágeno em níveis similares aos de células de recém-natos (três a oito dias de vida). Esses resultados sugerem que os níveis basais reduzidos da síntese de colágeno em "células maduras" não são devidos a níveis reduzidos de m-RNA dos colágenos I e III, mas sim a eventos reguladores pós-translacionais. Sendo assim, uma vez que o AA é capaz de superar a proliferação diminuída dos fibroblastos dérmicos na pele envelhecida e, ao mesmo tempo, induzir a síntese de colágeno tipos I e III, ele deve se mostrar vantajoso e beneficiar o processo de cicatrização.

Um colágeno sintetizado (KOTCH e RAINES, 2006) foi obtido a partir de fragmentos pequenos, tendo sido as três cadeias ligadas, surpreendentemente por pontes dissulfeto. Análises por espectrometria, ultracentrifugação analítica, microscopia de força atômica e de feixe de elétrons mostraram que essas cadeias (fragmentos) interagiram via formação de tripla hélice intermolecular, essa tripla hélice derivada de peptídios sintéticos são bem menores (<10nm) que o colágeno natural (~300nm) limitando sua aplicação (KOTCH e RAINES, 2006). O resultado se assemelha muito ao colágeno natural, e alguns são mais longos (>400nm) que qualquer colágeno conhecido (KOTCH e RAINES, 2006).

Especificamente, foram preparados fragmentos de colágeno I e II nos quais três cadeias helicogênicas foram ligadas por um par de ligações dissulfeto de cisteína, o grupo tiol desprotegido da cadeia $\alpha 1$ reagiu com nitro-pyridinesulfenyl-tiol (p-Npys-tiol) ativado na resina, ligado a cadeia $\alpha 2$ em tampão aquoso para formar o heterodímero $\alpha 1\alpha 2$. O heterodímero não foi protegido e seu grupo tiol foi ativado com nitro-pyridinesulfenyl-

cloreto (o-Npys-Cl) e reagido com outra cadeia também não protegida ($\alpha 1\alpha 1'$). A reação ocorre em um suporte sólido, sendo esse acrilamida polietileno glicol copolimerizada à resina (KOTCH e RAINES, 2006).

O colágeno sintetizado mimetiza a estrutura e o comportamento térmico do colágeno natural. O controle sobre a estabilidade e em alguma extensão, do comprimento das interações foi alcançada pela modulação da composição de aminoácidos, temperatura e solvente da reação. Foi notório que a estratégia de auto interação utilizada para fornecer as fibrilas de colágeno de 1nm de diâmetro e próximo de 1 μ m de comprimento foi somente composto de três a quatro aminoácidos proteinogênicos. Fragmentos como 1 e 2 podem ser sintetizados quimicamente para expressar motivos que promovam adesão celular para engenharia de tecidos, empacotamento lateral para promover arquiteturas di ou tridimensionais e coordenação metálica para produção de nanofios, sendo modelos para materiais de biomedicina e nanotecnologia (KOTCH e RAINES, 2006).

A degradação da MEC se constitui em um evento essencial em muitos processos fisiológicos como durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos. Por outro lado, sua excessiva degradação pode acarretar no desenvolvimento de várias condições patológicas, dentre as quais citam-se artrite reumatóide, osteoartrite e doenças autoimunes (WESTERMARCK e KAHARI, 1999). Tal fato também está diretamente relacionado ao processo de invasão e metástase tumoral, o qual se constitui no principal fator prognóstico dos pacientes portadores de câncer (CHAMBERS e MATRISIAN, 1997).

Algumas proteases específicas conhecidas como metaloproteinases (MMPs), do inglês “matrix metalloproteinases”, formam uma importante família de endopeptidases metaldependentes, secretadas na forma inativa, com zinco no sítio ativo (WESTERMARCK e KAHARI, 1999; CURRAN e MURRAY, 2000).

Existem, atualmente, no mínimo, 20 tipos de MMPs humanas, agrupadas de acordo com a estrutura e substrato específico em: collagenases (MMP-1,-8 e 13), estromelisinases, gelatinases (MMP-2, -9) e metaloproteinases ligadas à membrana plasmática (THOMAS, 1999; NABESHIMA, 2002).

De acordo com CURRAN e MURRAY (2000) e NABESHIMA et al.(2002), a superexpressão das MMPs tem sido evidenciada e relacionada ao prognóstico em diversos tipos de carcinomas, o que pode ser usado para o desenvolvimento de drogas inibidoras dessas proteínas para auxiliar na terapia anticâncer.

Essas enzimas podem ser produzidas tanto pelo estroma tumoral como pelas próprias células neoplásicas que segundo YVES e DERDERCK (2004) também podem interferir no processo de adesão célula-célula principalmente sobre o complexo E-caderina/N-catenina (pela degradação da E-caderina), facilitando o processo de invasão.

Analizando 25 carcinomas epidermóides orais não metastáticos e 19 metastáticos através da técnica imuno-histoquímica e zimografia, HONG et al. (2000) compararam a expressão e atividade das MMPs-2 e -9 nestes grupos e detectaram que a MMP-9 exercia um papel mais importante no desenvolvimento de metástase do que a MMP-2. Adicionalmente, esse estudo mostrou que não existe correlação entre o grau histológico desses carcinomas e a expressão das MMPs, sugerindo que a diferenciação histológica das células cancerosas não interfere na expressão das MMPs.

NABESHIMA et al. (2002) relataram que as MMPs-2 e -4 são capazes de clivar o sítio 2 da laminina-5, acarretando estimulação da proliferação e migração das células neoplásicas.

➤ **colágeno fibrilar *versus* tumorigênese**

As células de melanoma formam tumor maligno tipo 1 conhecido pela interação com o estroma circundante via fatores de crescimento, assim como interações célula-célula. O melanoma humano produz uma variedade de substâncias relevantes na indução da angiogênese, incluindo citocinas angiogênicas, componentes da matriz extracelular e metaloproteinases. Os fibroblastos se comunicam com as células de melanoma via fatores de crescimento, citocinas e interações célula-célula. As células de melanoma têm mostrado alteração da expressão de E-caderina para N-caderina, resultando na habilidade de se comunicar com fibroblastos via N-caderina mediada por junções, enquanto ao mesmo tempo perde a comunicação com os queratócitos (GOLDSTEIN et al., 2005).

No estudo de GOLDSTEIN et al. (2005) foi empregado um ensaio com a matriz de colágeno tridimensional (3D) para avaliar a habilidade de várias linhagens de célula de melanoma na indução da angiogênese com e sem adição de fibroblastos. A maioria das

células de melanoma sozinhas apresentou uma resposta limitada ou negativa quanto a angiogênese. O meio com colágeno sem células não suportou a angiogênese. Por outro lado os fibroblastos foram capazes de promover uma significativa angiogênese em todas as linhagens de células de melanoma utilizadas. Mesmo que a resposta à angiogênese das diferentes linhagens de melanoma tenha sido variável, somente foi significativa em combinação com fibroblastos ($p < 0,01$). As 3 linhagens de crescimento radial vertical (VGP) de melanoma foram capazes de induzir a formação de rede das células endoteliais microvasculares de derme humana (HMVEC) no meio de colágeno. Nenhuma das linhagens de melanoma foi capaz de induzir significativamente a rede de HMVEC. Com a adição de fibroblastos ocorre a recuperação da resposta angiogênica das 7 linhagens de células de melanoma avaliadas, aumentando o rendimento significativo da rede de HMVEC em relação às células de melanoma ($p < 0,01$). O número de rede de HMVEC suportado pela combinação de células de melanoma com fibroblastos foi significativamente maior que somente fibroblastos isolados para 6 das 6 linhagens de melanoma avaliadas ($p < 0,05$) (GOLDSTEIN et al., 2005).

Os fatores angiogênicos interleucina 8 (IL-8) e a proteína 1 monócito quimiostática (MCP-1) são conhecidos como fatores de crescimento pró-angiogênicos e a metaloproteinase-2 inibidor tecidual (TIMP-2) é conhecida como inibidor da angiogênese foram significativamente aumentadas quando da combinação no meio de melanoma e fibroblastos em relação ao meio somente com fibroblastos ($p < 0,05$). Os fatores IL-8 and TIMP-2 aparecem mais elevadas quando da associação de melanoma e fibroblastos, mas o MCP-1 é mais elevada somente quando se tem no meio fibroblastos (GOLDSTEIN et al., 2005).

Foi também demonstrado que pele humana normal derivada de HMVEC vai migrar mais prontamente na resposta em meio condicionado com fibroblastos derivados de pele normal humana que em meio obtido de células de melanoma malignos (GOLDSTEIN et al., 2005).

Este estudo demonstrou que os fibroblastos apresentam um potencial angiogênico inerente, e esta habilidade é mais forte que a habilidade angiogênica de células de melanoma, e mais notadamente quando se apresentam associadas, revelando um fenômeno sinérgico com uma resposta angiogênica significativamente maior que ambas as células podem induzir independentemente, particularmente com algumas células VGP e melanoma. Os resultados

da matriz tridimensional de colágeno apontam que a interação direta célula-célula tem provavelmente um papel na migração das células endoteliais e na formação da rede nos experimentos de angiogênese com o colágeno (GOLDSTEIN et al., 2005). No mesmo estudo (GOLDSTEIN et al., 2005) mostraram que os melanomas requereram os fibroblastos para suportarem a invasão, migração e formação de rede capilar dos HMVEC. Em estudos de VELAZQUEZ et al.(2002) foram demonstrados que a derme normal de fibroblastos humanos induz a microvascularização humana levando células endoteliais a invadir/ migrar no colágeno e a formar redes capilares, enquanto algumas linhagens de células de melanoma foram incapazes de suportar este tipo de angiogênese sob condições idênticas de cultura. Em VELAZQUEZ et al.(2002) estudo *in vitro* com o modelo de angiogênese e células humanas, os fibroblastos diminuíram a proliferação de células endoteliais (EC), aumentaram a migração dessas células, e inibiram a apoptose de EC. Estes resultados sugeriram que os fibroblastos estimularam a angiogênese e que as células de melanoma podem adquirir a habilidade de se comunicar com as células do estroma, levantando a hipótese de que os fibroblastos modulariam a angiogênese em células de melanoma. Esta hipótese abriria a possibilidade de novas terapias anti-angiogênicas e anti-neoplásicas. (VELAZQUEZ et al.(2002).

A participação do colágeno na angiogênese (CARVALHO e PIMENTEL, 2001; MANELA-AZULAY et al. , 2003) na presença de oxigênio, a síntese de colágeno, a angiogênese e a epitelização são aceleradas. O estímulo básico para a angiogênese é a hipóxia, mas são necessários níveis mínimos de oxigênio para que a síntese de colágeno seja eficiente e viável.

O colágeno bovino tipo I (BIC), o qual é usado frequentemente como componente fibroso da matriz extracelular em modelos de culturas de célula, inibe a progressão do ciclo celular do melanoma via a sub-regulação do p27 (CHO et al. 2005). O BIC também induz a síntese de óxido nítrico em macrófagos através da ativação dos efetores JunB/AP-1 e NF- κ B. A análise do ciclo celular revela que o BIC suprime completamente a proliferação das células Raw264.7 com inibição da porcentagem de células na fase S e decréscimo recíproco na fase G0/G1. A síntese de DNA foi também inibida pelo BIC, como foi evidenciado pelo decréscimo da incorporação celular da timidina [3 H]. A parada em G1/S induzida pelo BIC

foi invertida pela inibição química da quinase-3 fosfatidilinositol ou pela super expressão da sub unidade p85 da quinase PI3. Tanto a PD98059 ou a transfecção com a quinase-1, proteína quinase ativadora de mitógeno ou a quinase 1 com N-terminal c-Jun liberaram o ciclo celular do bloqueio. As análises de imunoblot revelaram que níveis das ciclinas D1, A e B1 foram parcialmente ou completamente sub-reguladas por BIC, mas as ciclinas E, p21 e p27 foram minimamente alteradas. A inibição química e experimentos com a super-expressão mutante negativa dominante revelaram que tanto a inibição da quinase-PI3 como a transfecção de JNK1(-) preveniram o decréscimo das ciclinas D1, A, B1 por BIC, indicando que as vias da quinase-PI3 e JNK1 estão associadas com a interrupção das ciclinas. O envolvimento da via MKK1 quinase regulada por sinal extracelular-1/2 (ERK1/2) foi responsável pela supressão das ciclinas A e B1, mas não da ciclina D1. Estudo de CARMELIET e JAIN (2000) mostrou que o BIC inibiu a proliferação das células Raw264.7 e que as vias envolvidas foram quinase pI3 e quinases ativadoras de mitógenos que regulam a parada do ciclo celular (CHO et al, 2005).

O melanoma maligno causa a morte por doenças da pele. PASCO et al (2005) mostraram os efeitos do colágeno tipo IV na progressão do melanoma. Muitas seqüências diferentes do colágeno tipo IV promoveram a adesão celular, migração e invasão do melanoma. A conformação de tripla hélice do domínio colagênico desempenha um papel crítico em algumas destas interações. Entretanto, os estudos citados (PASCO et al., 2005) demonstraram que a seqüência de domínio $\alpha 3(IV)$ NC1 inibiu a célula de melanoma quanto à proliferação, migração e invasão pelo decréscimo da produção e ativação das metaloproteinases de matriz (MMPs). Seqüências peptídicas das cadeias do colágeno IV $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, e $\alpha 3(IV)$ chamadas de arresten, canstatina e tumastatina, respectivamente, inibiram a angiogênese (PASCO et al., 2005).

Durante a invasão maligna de células tumorais é estabelecido um contato com as proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno fibrilar. Para promoção da barreira física contra invasão, o colágeno fibrilar também restringe a proliferação celular. Assumiu-se que a atividade regulatória de crescimento do colágeno fibrilar é resultado do efeito indireto restritivo no espalhamento celular e organização do citoesqueleto. Em estudo de WALL et al.(2005) foi evidenciado o efeito inibitório do colágeno fibrilar na proliferação de

melanoma humano e células de fibrosarcoma que envolveu a ativação de receptor-2 protéico transmembrana da tirosina quinase, independente dos efeitos no espalhamento celular. Células plaqueadas na presença de colágeno fibrilar foram bloqueadas no seu crescimento na fase G0/G1 do ciclo celular. Entretanto, o tratamento com genisteína, inibidor de tirosina quinase, sub-regulou este receptor-2 protéico transmembrana, ou a desglicosilação do colágeno que preveniu a ativação deste domínio do receptor-2 permitindo às células entrar no ciclo celular na presença do colágeno fibrilar sem o requerimento por espalhamento e organização da actina. Estes dados evidenciaram que novos mecanismos relacionados ao contato da célula tumoral com o colágeno fibrilar restringiram a proliferação (WALL et al., 2005).

Recente evidência sugere que a terapia anti-angiogênica é sensível ao p53 em tumores, indicando que o papel de regulação da angiogênese é feita pela regulação do fator p53. Neste estudo (TEODORO et al., 2006) ficou demonstrado que o p53 transcricional ativa o gene do colágeno α (II) prolil-4-hidroxilase[α (II)PH], resultando na liberação extracelular de fragmentos anti-angiogênicos do colágeno tipo IV e XVIII. Meios de cultura com células ectópicas condicionadas com expressão tanto do p53 ou do α (II)PH seletivamente inibe o crescimento de células endoteliais humanas primárias. Quando ocorre a distribuição da expressão destes genes, exógena ou intracelularmente, o gene α (II)PH inibe significativamente o crescimento tumoral em camundongos. Estes resultados sugerem que há uma inter-relação entre a genética e bioquímica da via de supressão do p53 e a síntese dos fragmentos anti-angiogênicos do colágeno (TEODORO et al., 2006).

Em estudo recente (ROTH et al., 2006) foi identificado um epítipo não conhecido (HUIV26) que é especificamente exposto após alterações na estrutura de tripla hélice do colágeno tipo IV. A exposição deste epítipo tem um papel fundamental na regulação da angiogênese *in vivo*. Entretanto, pouco se sabe sobre a habilidade das células tumorais de interagir com esse lado do epítipo e se esse regula a metástase da célula tumoral *in vivo*. Desse modo, muitos dos processos celulares que regulam a angiogênese também contribuem para a metástase tumoral. No trabalho citado (ROTH et al., 2006) foi verificado que células tumorais como as do melanoma B16F10 interagem com o colágeno tipo IV desnaturado em parte pelo reconhecimento do lado do epítipo HUIV26. A administração

sistemática do anticorpo monoclonal HUIV26 inibe a metástase do melanoma B16F10 em avaliação experimental *in vivo*. A partir dos resultados encontrados, foi sugerido que as células tumorais interagem com o epítopo HUIV26 tendo um papel importante na regulação da metástase e que esse epítopo pode representar um alvo terapêutico para controle do espalhamento do tumor para localidades distantes do foco tumoral no organismo humano. Um único epítopo HUIV26 no meio com colágeno regula a angiogênese e o comportamento celular endotelial, inibindo a adesão celular tumoral e a migração, consequentemente a metástase *in vitro* e experimental (ROTH et al., 2006).

Ciclo celular e tumorigênese

O crescimento celular envolve o aumento da massa celular, duplicação do ácido desoxiribonucleico (DNA) e divisão física da célula em duas células filhas idênticas (mitose). Tais eventos se processam por meio de fases conhecidas como G1-S-G2-M, que integram o ciclo celular (GUYTON e HALL, 2002; MALUMBRES e BARBACID, 2001). A divisão celular consiste de dois processos consecutivos, caracterizado principalmente pela replicação do DNA e segregação da replicação dos cromossomos em duas células separadas, a mitose (M). Os estágios da mitose incluem prófase, metáfase, anáfase e telófase. Analisando por microscopia, as células na interfase simplesmente crescem em tamanho, mas técnicas diferenciadas revelam que a interfase inclui as fases G1, S e G2 (HARTWELL e WEINERT, 1989). A replicação do DNA ocorre em uma parte específica da interfase chamada fase S. A fase S é precedida por um intervalo chamado G1 durante o qual as células são preparadas para a síntese de DNA e é seguida por um intervalo chamado G2 durante o qual as células se preparam para a mitose. As fases G1, S, G2 e M são tradicionalmente subdivisões do ciclo celular convencional. As células em G1 podem, antes da replicação do DNA, entrar no estágio chamado G0. As células em G0 constituem a maior parte das células que não estão em crescimento ou proliferação no organismo humano. Células em G1 que não se programaram para a replicação do DNA podem entrar em um estado de quiescência, denominado G0. Algumas células permanecem em G0 por dias ou anos. Por outro lado, o tempo de progressão entre a entrada em S até atingir M é praticamente contínuo (VERMEULEN et al., 2003; MCGOWAN, 2003; MORGAN, 1997; GENG et al., 1999; SHEAFF et al., 1997).

As células normais precisam receber sinais mitogênicos antes de passar de um estado quiescente para um estado proliferativo. Em resposta a sinais intracelulares ou vindos do meio ambiente, as células podem seguir vários caminhos: permanecer como estão (fase de quiescência); diferenciar-se; multiplicar-se; morrer (CLEMENS et al., 2002). A transição de uma fase do ciclo para outra é regulada por diferentes proteínas celulares. As proteínas chave para esta regulação são as enzimas quinases dependentes de ciclinas, que são proteases da família das serina-treonina ativadas em certos pontos do ciclo celular. Para fosforilar seus substratos, estas enzimas ligam-se a proteínas da família das ciclinas. Portanto as quinases ciclinas dependentes (CDKs) ativas são formadas de duas subunidades: uma catalítica e outra regulatória (ciclina). As CDKs monoméricas quase não tem atividade de quinases. Até o presente foram identificadas 9 quinases ciclina dependentes (CDKs), sendo que cinco delas são ativadas durante o ciclo celular. Na fase G1 (CDK2, CDK4, CDK6), na fase S (CDK2) e nas fases G2 e M (CDK1). Quando as CDKs são ativadas elas induzem fosforilações em cascata de proteínas selecionadas. Os níveis de ciclinas oscilam durante o ciclo celular, e desta forma periodicamente ativam as CDKs. Diferentes ciclinas são requeridas durante as diferentes fases do ciclo celular. As ciclinas tipo D, são três: ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3 que se ligam a CDK4 e CDK6, sendo este complexo ciclina-CDK essencial para entrada na fase G1. A ciclina D não é expressa periodicamente, mas é sintetizada enquanto persiste a estimulação do fator de crescimento. Outra ciclina de G1 é a ciclina E, que associa a CDK2 regulando a progressão da fase G1 para fase S. Existe na fase G1, um ponto específico denominado ponto de restrição (R), definido como start em estudos com leveduras. Após passarem este ponto, as células se tornam independentes dos estímulos mitogênicos. R representa um ponto de monitoramento dos sinais extracelulares e é usado para dividir as células em fases denominadas G1 inicial e G1 tardio. Os eventos moleculares que permitem às células passarem por R não foram bem definidos. Ciclina A se liga com a CDK2 e este complexo é requerido durante a fase S. No final da fase G2 e começo da fase M, a ciclina A complexa-se com CDK1 para promover a entrada da mitose. Mas na mitose a regulação é feita pela complexação da ciclina B com CDK1. Foram identificadas dezesseis ciclinas, mas nem todas relacionadas ao controle do ciclo celular. As ciclinas A e B contém uma caixa de

destruição e as ciclinas D e E contêm a sequência PEST (rica em resíduos de prolina, ácido glutâmico, serina e treonina), estas são sequências proteicas requeridas para eficiência na ubiquitinação mediada pela proteólise da ciclina no final das fases do ciclo celular (VERMEULEN et al., 2003; McGOWAN, 2003; MORRIS e DYSON, 2001).

A atividade das CDK pode ser controlada por proteínas inibitórias do ciclo celular, chamadas de inibidores de CDK (CDI) que se ligam ao CDK sozinho ou complexado com ciclina e regula a atividade da CDK. Duas famílias distintas de inibidores de CDK foram descobertas, a família INK4 e a família das CIP/KIP. A família das INK4 inclui p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), que especificamente inativa CDKs da fase G1 (CDK4 e CDK6). A forma estável dos CKIs complexa-se com a enzima CDK antes da ligação com a ciclina, prevenindo a associação com a ciclina D. A segunda família dos inibidores são Cip/Kip inclui p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2). Esses inibidores inativam o complexo CDK-ciclina. Eles inibem ciclinas quinases da fase G1 e em menor proporção o complexo CDK1-ciclina B. O p21 também inibe a síntese de DNA pela ligação e inativação da proliferação do antígeno nuclear celular (PCNA). Os CKI são regulados tanto por sinais internos e externos: a expressão do p21 é feita sob controle transcripcional do gene supressor de tumor p53. O gene promotor p21 contém um sítio de ligação com o p53, que permite que o p53 ative transcripcionalmente o gene p21. A expressão e ativação dos, respectivos p15 e p27, aumentam a resposta do fator de crescimento β . (TGF- β), contribuindo para a inibição do crescimento (VERMEULEN et al., 2003; MORGAN, 1997; SANDAL, 2002).

O estudo de maior interesse é do substrato de CDK4/6- ciclina D, produto do gene supressor do tumor de retinoblastoma (pRb). Durante o começo da G1, pRb começa a fosforilar e isto leva a destruição do complexo com a proteína histona diacetilada (HDAC) e liberação de fatores transcripcionais E2F-1 e DP-1, que regulam positivamente os genes de transcrição, resultando em produtos requeridos para progressão da fase S, incluindo ciclina A, ciclina E, Cdc25. O pRb permanece no estado hiperfosforilado para manutenção do ciclo celular e o complexo CDK2-ciclina E participa para manter esta forma hiperfosforilada. (MANGONE e FEDERICO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.137; VERMEULEN et al., 2003; MORRIS e DYSON, 2001).

Nos casos de células danificadas severamente, p53 induz a morte celular pela ativação dos genes Bax, Fas e genes envolvidos no estresse oxidativo, que estão envolvidos na sinalização da apoptose. Diferentes proteínas quinases reconhecem o dano do DNA, e estas quinases fosforilam o p53 em resposta ao dano do DNA, resultando no bloqueio do ciclo celular pelo p21, pelo menos no ponto de checagem G1/S (MANGONE e FEDERICO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.137; HARTWELL e WEINERT, 1989; VERMEULEN et al., 2003; GENG et al., 1999; MORRIS e DYSON, 2001).

No câncer, há alterações fundamentais no controle genético da divisão celular, resultando na falta de restrição da proliferação da célula. Mutações principalmente ocorrem em duas classes de genes: proto-oncogenes e genes supressores de tumor como o pRb e p53 que resultam na disfunção das proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular. (CAMARGO e COSTA, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.71; VERMEULEN et al., 2003).

O supressor de tumor p53 apresenta uma sequência específica da proteína que se liga ao DNA, que é capaz de induzir tanto a parada do ciclo celular ou apoptose. Outros mecanismos, como a ligação à proteínas oncogênicas virais, podem alterar ou bloquear a função do p53 (MANGONE e FEDERICO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.137; VERMEULEN et al., 2003).

No desenvolvimento do tumor estão envolvidos genes no controle da proliferação: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (CAMARGO e COSTA, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.71; GUYTON e HALL, 2002; VERMEULEN et al., 2003).

Os proto-oncogenes, geralmente, estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e, quando alterados, são chamados de oncogenes. Os genes supressores de tumor, ao contrário, atuam restringindo a proliferação celular, e a sua inativação está associada a uma perda de função. Recentemente, em alguns tumores, foi comprovado o envolvimento de uma terceira classe de genes que codificam proteínas relacionadas ao reparo do DNA (CAMARGO e COSTA, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.71; SOUSSI, 2000).

Os oncogenes já caracterizados são atualmente classificados em quatro grupos de acordo com seu modo de atuação: 1) os fatores de crescimento; 2) os receptores para fatores de crescimento; 3) os transdutores de sinal; e 4) os fatores de transcrição. Detalhes sobre esse

mecanismo poderão ser encontrados em CAMARGO e COSTA, 2003 apud BRENTANI et al., (2003)p.71.

A caracterização de genes supressores de tumor sempre foi dificultada pelo fenótipo maligno se manifestar apenas após a perda, a mutação ou a inativação do gene em estudo (CAMARGO e COSTA, 2003 apud BRENTANI et al., (2003)p.71.).

➤ **reparo do DNA**

Os seres humanos são muito expostos a uma variedade de carcinógenos ambientais. Embora a exposição a agentes naturais que causam lesão ao DNA, como radiação ionizante, luz solar e carcinógenos dietéticos, seja comum, o câncer constitui uma consequência relativamente rara desses encontros. Essa situação favorável resulta da capacidade das células normais de proceder ao reparo do DNA danificado, impedindo, assim, a ocorrência de mutações em genes que regulam o crescimento e a apoptose celulares. Além da possível lesão do DNA por agentes ambientais, o DNA das células normais em divisão também é suscetível a alterações decorrentes de erros, se não forem imediatamente consertados, também podem levar a célula a uma transformação neoplásica. A importância do reparo do DNA na manutenção da integridade do genoma é reforçada pela ocorrência de vários distúrbios hereditários, caracterizados por defeitos em genes que codificam proteínas envolvidas no reparo do DNA (GUYTON e HALL, 2002).

A ocorrência de lesões no DNA requer parada temporária da progressão no ciclo celular de forma a haver tempo para o reparo e para prevenir a fixação de mutações deletérias (McGOWAN, 2003).

No ciclo celular normal, o controle é regulado por sensores que podem detectar defeitos estruturais do DNA ou na função cromossômica e ativar o reparo do DNA atrasando a progressão do ciclo até que o reparo do DNA esteja completo e possa ser reiniciada a progressão. Os pontos de verificação estão: no ponto de restrição em G1 e no fim da fase S (pontos de checagem de G1); no limite G2/M (ponto de checagem de G2); na saída de M (ponto de checagem da metáfase) (McGOWAN, 2003).

➤ **apoptose**

A morte da célula, ao longo do crescimento e diferenciação, é a parte crítica do ciclo celular. O controle homeostático do número de células ocorre pelo resultado do balanço

dinâmico entre proliferação e morte celular. Nos últimos anos, o foco tem sido na ocorrência fisiológica da morte celular e seu papel na homeostase. Os cientistas têm chamado a morte natural de apoptose ou morte programada da célula, a qual desempenha um papel importante e crucial nos processos fisiológicos e patológicos (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001).

Os estudos recentes apontam para o fato de que a morte celular fisiológica era baseada no processo patológico, que ocorre quando as células são sujeitas a alguma injúria do ambiente. Esta morte celular acidental, chamada de necrose, ocorre em resposta a uma variedade de condições adversas e substâncias tóxicas, incluindo hipertermia, hipoxia, isquemia, ataque do complemento, drogas metabólicas e trauma direto à célula (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001).

A célula quando sofre necrose exibe características morfológicas e bioquímicas típicas. Inicialmente, alterações incluindo intumescimento do citoplasma e organelas, especialmente a mitocôndria, com uma alteração leve no núcleo. Estas mudanças levam a dissolução das organelas e ruptura da membrana plasmática permitindo que os componentes celulares extravasem para o espaço extracelular. As alterações morfológicas se devem à perda do controle da seletividade da membrana plasmática. Estas alterações ocorrem em resposta ao desaparecimento da atividade de bombeamento de íons da membrana, tanto diretamente como pelo dano à membrana e também pela depleção de energia celular. O aumento citosólico de cálcio resulta na ativação de ligações dos fosfolipídios na membrana, que ocasiona a sua destruição. A liberação de hidrolases devido a ruptura de lisossomos, causando uma rápida aceleração da desintegração celular nos estágios finais da necrose, uma rápida diminuição nos níveis de proteína, RNA e DNA. A exposição do DNA ocorre pela digestão proteolítica das histonas que são rompidas pela nuclease desoxiribonuclease em fragmentos. A necrose afeta tipicamente grupos de células contínuas e de uma reação inflamatória que geralmente ocorre em tecidos adjacentes em resposta a liberação de fragmentos celulares (MANGONE e FEDERICO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.137; SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001).

Em contraste com a morte celular induzida por injúria (necrose), algumas investigações têm mostrado uma morfologia distinta que ocorre espontaneamente durante a morte celular em diferentes tecidos e sob várias condições. Este tipo de morte se processa tão rápido que é difícil de ser observada. O nome deste tipo de morte celular é apoptose, a qual pode ser observada em dois estágios. No primeiro, a célula sofre condensação nuclear e citoplasmática, eventualmente havendo rupturas de fragmentos ligados a membrana mantendo as organelas estruturalmente intactas. No segundo estágio estes fragmentos celulares, denominados corpos apoptóticos, são fagocitados por células vizinhas e rapidamente degradados. A apoptose é observada em diferentes células, saudáveis e neoplásicas, adultas e embrionárias, podendo ser induzida por agentes fisiológicos naturais ou nocivos, mas é basicamente um processo fisiológico que tem um papel importante na regulação das populações celulares (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001; HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Apoptose geralmente afeta células únicas ou grupos pequenos de células. As primeiras mudanças incluem a perda das junções celulares, e estruturas da membrana plasmática especializada. Ao mesmo tempo o citoplasma condensa e a cromatina nuclear coalesce em uma ou mais corpos apoptóticos. Conforme o processo continua, o núcleo fragmenta em alguns pedaços e o volume citoplasmático é aparentemente associado com a perda de fluido intracelular e íons. Os corpos apoptóticos mostram uma dilatação progressiva e degradação das organelas citoplasmáticas, processo chamado de necrose secundária.

Devido ao processo de fragmentação celular ocorrer extremamente rápido, e a ausência de inflamação, se torna difícil observar o processo de morte programada da célula. Muitos hormônios e fatores de crescimento responsivos de tecidos e órgãos são mediadores para apoptose sob a adição ou remoção de um fator regulatório apropriado (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001).

Apoptose ocorre em tumores e outros tecidos neoplásicos tanto espontaneamente ou em resposta a algum tratamento. Alguns exemplos incluem tipos de leucemia, linfoma, tumor de próstata, câncer pancreático, tumor de mama, e outros. Algumas drogas anti-câncer tem mostrado induzir apoptose em células específicas. Certas condições adversas, porém brandas podem resultar em injúria celular levando a morte programada da célula. Quando

estes tratamentos são em alta dosagem levam as células à necrose, sugerindo que uma injúria suave leva a célula a cometer um suicídio, talvez para prevenir a mutação inerente, quando a célula é exposta a condições severas ocasionando a morte direta por necrose (MANGONE e FEDERICO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.137; SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001).

As alterações morfológicas da apoptose são relativamente simples de observar, mas os mecanismos bioquímicos e moleculares são difíceis de compreender. A falta de informação é principalmente devido às pequenas populações de células apoptóticas dentro dos tecidos. Seguem alterações bioquímicas que ocorrem durante a apoptose:

Degradação da cromatina

A degradação do DNA ocorre em um padrão muito específico produzindo fragmentos de DNA que são múltiplos de 180-200 pares de base. Este é praticamente o único evento bioquímico que ocorre durante o processo apoptótico (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006).

A ruptura internucleossomal do DNA é específica para a apoptose, quando as células são mortas pelos agentes que induzem a necrose o DNA não é fragmentado e nem tão pouco degradado não especificamente em partículas menores. As células apoptóticas têm seu DNA mais degradado que as células que possuem sua cromatina parcialmente degradada (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

Rotas de sinalização intracelular

A descoberta de que a degradação do DNA internucleossomal ocorre na maioria das situações de apoptose suporta fortemente esta idéia. Avaliando uma variedade de exemplos de apoptose, tem sido mostrado que mediadores de apoptose podem ser divididos em um número reduzido de classes. O maior grupo inclui aqueles mediadores que mais provavelmente induzem a apoptose por ligação com seus respectivos ligantes de membrana ou receptores intracelulares promovendo alterações no ambiente intracelular. Este grupo é tipicamente os hormônios e fatores de crescimento que regulam a apoptose em tipos específicos de células. A segunda categoria é a apoptose mediada por célula do sistema imune. Neste caso células específicas sofrem apoptose em resposta às alterações no ambiente intracelular causado pela interação com células citotóxicas. O terceiro grupo

inclui apoptose em resposta a efeitos adversos suaves, drogas anti-câncer, toxinas e injúria, neste caso o mediador da morte celular não é conhecido, mas presumidamente envolve alterações no ambiente intracelular que diretamente induz a apoptose ou leva a célula a sofrer apoptose em resposta ao dano induzido. Nesta sinalização intracelular ocorre o aumento do cálcio intracelular, ativação das proteínas quinases A e C, o requerimento da síntese de macromoléculas e alterações da expressão gênica (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006; ZÖRNIG et al., 2001; HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Nuclease endógena

O fato de aumentar os níveis de cálcio intracelular para apoptose, durante a fragmentação extensiva do DNA, sugere o papel do fluxo de cálcio na ativação da nuclease endógena dependente de cálcio. Alguns investigadores têm avaliado a dependência da nuclease por cálcio e combinação de cálcio com magnésio em células apoptóticas. Timócitos irradiados na presença da endonuclease dependente de cálcio e magnésio nuclear que atuam como mediadores na degradação de DNA internucleossomal. Quando essa enzima é mantida inativa pela eliminação de cálcio e magnésio, a irradiação não causa danos no DNA, indicando que a ruptura é devida à ativação da nuclease e o DNA não é diretamente afetado pela irradiação. Essa enzima pode ser detectada no citoplasma e no núcleo, mas com maior atividade no núcleo. Alguns investigadores têm atentado para o fato que as nucleases são responsáveis pela fragmentação de DNA em células durante a apoptose. A atividade foi detectada na presença somente de cálcio e/ou manganês (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006).

Devido a apoptose ser um evento prevalente no controle de populações específicas de células, a facilidade em prever a habilidade para regular a apoptose pode servir muito para aplicações em distintas terapias, como por exemplo, a neoplasia. A taxa de crescimento tumoral é balanceada pelas taxas de mitose, migração, diferenciação e morte por necrose e apoptose. É claro que na maioria dos tumores se encontram zonas que estão sofrendo apoptose, representando o alvo fácil para regressão tumoral induzida. Alguns exemplos existem de apoptose induzida em células neoplásicas, como tumores responsivos por hormônios que sofrem apoptose *in vivo* quando recebe um estímulo apropriado. Outra maneira de indução de apoptose é com anticorpos monoclonais. Um exemplo é o anticorpo

monoclonal contra o antígeno de superfície dos linfócitos Apo-1 que induz apoptose nas células expressado como marcador. O anti-Apo-1 é efetivo contra as células transformadas tipo T humanas com HTLV-1 e células T de leucemia de adulto (MANGONE e FEDERICO, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.137; SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 2006).

➤ **metástase**

A integridade de um determinado tecido, assim como a sua função, é conferida por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular (MELO, JUNQUEIRA e CHAMMAS, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.201). Esse equilíbrio é conferido por meio de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando esse equilíbrio é perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem um tumor primário. No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem por meio da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos. Esse processo é denominado metástase (MELO, JUNQUEIRA e CHAMMAS, 2003 apud BRENTANI et al., 2003 p.201; GUYTON e HALL, 2002).

A metástase de um tumor maligno que envolve interações célula-célula e célula-matriz extracelular, que regula a expressão e localização das enzimas proteolíticas.

A metástase do tumor primário para localidades distantes envolve uma variedade de moléculas que agem de maneira integrada, diversos eventos interconectados. O entendimento dos processos bioquímicos, moleculares e celulares que regulam a metástase tumoral é de grande importância. A cascata metastática é conhecida com a inicialização por uma série de alterações genéticas levando mudanças nas interações célula-célula o que permite dissociação das células do tumor primário. Esses eventos são seguidos por invasão e migração local através da modificação proteolítica na matriz extracelular. Para estabelecer a metástase secundária, as células malignas evadem à vigilância imune do hospedeiro, aprisionando a microvascularização e o extravasamento da circulação. Finalmente as células tumorais podem invadir a matriz extracelular, proliferar e recrutar novos vasos

sangüíneos para a indução da angiogênese e assim expandindo para formar o foco metastático secundário. Entretanto, é bem aceito que as interações das células tumorais com a matriz extracelular tem função importante no papel da metástase. O conhecimento sobre a habilidade do tumor em interagir com a matriz remodelada enzimaticamente ou se essas interações contribuem funcionalmente para o espalhamento do tumor para locais distantes do organismo é relativamente pequeno. A remodelação proteolítica e subsequente interação celular tumoral com a matriz extracelular regula a invasão tumoral.

Devido ao fato da metástase envolver uma complexa cascata de eventos interdependentes, um número de ensaios *in vitro* e *in vivo* tem sido conduzidos para investigar os processos celulares individuais na metástase incluindo adesão, invasão, migração e proliferação. Entretanto, muitos estudos tem confirmado a importância de fatores de crescimento secretados especificamente para certos alvos, proteases, adesão na superfície celular, receptores e muitas moléculas regulatórias intracelulares na abordagem dos processos metastáticos, mesmo com certa limitação devido a instabilidade genética das células tumorais. Interessantemente, um dos receptores mais bem estudados é a integrina $\alpha\beta3$ devido ao seu papel importante no crescimento e metástase tumoral (ROTH et al., 2006). Elevada expressão da integrina $\alpha\beta3$ tem correlação forte com a fase de crescimento vertical da metástase do melanoma e um pobre prognóstico clínico no carcinoma de mama metastático. Estudos anteriores demonstraram que antagonistas da integrina $\alpha\beta3$ podem inibir a metástase em modelos animais. Entretanto, muitos ligantes da matriz extracelular para $\alpha\beta3$ tem sido identificados, incluindo vibronectina e colágeno desnaturado, pouco é sabido sobre suas relevâncias funcionais *in vivo* no controle de processos invasivos celulares, tais como metástase (ROTH et al., 2006).

Numerosos estudos sugerem a remodelação proteolítica na matriz extracelular e subsequente proliferação celular, invasão e migração como importantes no papel metastático tumoral. De fato, a inibição das metaloproteinases tem sido demonstrada como inibidor metastático em muitos modelos. Alguns mecanismos tem sido sugeridos a serem considerados com atividade anti-metastática e anti-tumoral associadas a inibição de enzimas proteolíticas, sua contribuição na cascata metastática é ainda não tão bem compreendida. Enzimas proteolíticas tais como metaloproteinases podem desempenhar

uma função de liberar fatores de crescimento imobilizados na matriz que o tumor necessita para proliferação, migração e sobrevivência (ROTH et al., 2006).

➤ **caspases**

Caspase 1 é um protótipo da grande família de proteases cujos membros tem função importante no processo inflamatório e apoptótico. As caspases são expressas como proenzimas inativas e são ativadas por clivagem proteolítica após um estímulo de morte celular. Os membros dessa família das caspases possuem uma estrutura comum que consiste de três domínios: amino-terminal, subunidade grande e outra pequena. No caso da caspase 1, ocorre uma porção com resíduos volumosos hidrofóbicos, enquanto que a caspase 3 consiste preferencialmente de resíduos pouco volumosos, tais como aspartato.

As caspases tem função tanto na iniciação da apoptose em resposta a um sinal proapoptótico como na rota efetora para desorganizar a célula. Baseando-se nisto, as caspases podem se dividir em caspases iniciadoras, que ligam sinais de morte ao programa de morte celular, e caspases efetoras, que executam um programa coordenado de proteólise, resultando na destruição de estruturas celulares críticas envolvidas na homeostase e reparação da célula (NIGG, 2001).

Na ativação das caspases inicia-se uma cascata proteolítica que permite uma rápida transmissão e amplificação exponencial do estímulo de morte celular.. Caspases efetoras, tal como a caspase 3 são ativadas, culminando na destruição da célula por apoptose. Dependendo do sinal de morte celular envolvido, este processo parece envolver a rota de disfunção mitocondrial e liberação do citocromo C, ou alternativamente, uma rota independente da mitocôndria (NIGG, 2001).

➤ **angiogênese**

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos, que ocorre pela extensão local de vasos pré-existentes (FOLKMAN, 1995). As células endoteliais (ECs) compreendem vasos angiogênicos proliferativos, migratórios e que agregam em novos capilares em resposta a sinais celular e humorais, os quais não foram ainda totalmente definidos (CARMELIET e JAIN, 2000).

A angiogênese ocorre em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos e é remodelada no estabelecimento da rede primitiva de vasos sanguíneos. A vasculogênese,

que é a formação dessa rede primitiva de vasos ocorre no desenvolvimento embrionário. A compreensão desses fatores que regulam o crescimento e diferenciação das células endoteliais pode sugerir novas possibilidades de métodos para a intervenção na grande variedade de doenças (YAMAGUCHI et al., 1993).

A regulação da angiogênese durante o crescimento tumoral vem sendo melhor entendida. A mudança ocorre durante a proliferação das células endoteliais como se elas se organizassem para formar os vasos sanguíneos. O que determina se a mudança ocorre na angiogênese ou fora dela são os níveis de inibidores angiogênicos comparados com ativadores. Mais de 20 ativadores e 20 inibidores endógenos têm sido caracterizados. Se o tumor permanece no estado dormiente *versus* sua progressão pode refletir o balanço desses ativadores e inibidores. Estes fatores podem ser regulados através de alterações no micro ambiente, enfatizando a importância das interações célula-matriz extracelular. Há pelo menos quatro mecanismos potenciais nos quais o tumor pode estimular a angiogênese. A primeira hipótese é que o tumor não pode crescer mais de 1 ou 2mm antes de estimular os novos vasos sanguíneos germinativos. Tal processo envolve a secreção por parte dos tumores de fatores de crescimento angiogênicos, que irão estimular a atividade da tirosina quinase nas células endoteliais. Os tumores podem secretar fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e assim que eles crescem, outros fatores de crescimento angiogênicos podem ser gerados. O segundo mecanismo sugere que o tumor pode confinar vasculatura existente. Cada vez mais, tumores crescem ao redor de vasos sanguíneos e mediam a regressão dos vasos pela super expressão da Ang2. A secreção desse fator induz a perda das estruturas da matriz extracelular e da integridade de vasos. Isto resulta na necrose tumoral central. Hipóxia estimula a produção de VEGF e a angiogênese ocorre em volta da periferia do tumor. O terceiro mecanismo é que a regulação da angiogênese pode, em parte, ocorrer pela circulação dos precursores hematopoiéticos. A circulação dos precursores das células endoteliais CD34⁺ tem sido encontrados em áreas de angiogênese nas feridas dos tumores. A natureza funcional dessas células endoteliais e sua contribuição na angiogênese remetem a falta de entendimento e merece intensa investigação. Evidências para a regulação genética da angiogênese se mostraram através de estudos com camundongos Id-nocauteados. Esses camundongos são de uma família que desenvolvem genes que diminuem ou inibe o

crescimento tumoral. Esses dados sugerem que células precursoras hemangioendotelial circulante contribui para a angiogênese. O quarto mecanismo em potencial é conhecido como mimetização vascular. A avaliação do tamanho, poro, topografia, estrutura e permeabilidade vascular são mostrados como variável com tamanho de poros endoteliais nos tumores comparados com tecidos normais, e tem sido encontrada irregularidade e heterogeneidade dentro do vaso. Estudos de permeabilidade mostraram aumento da permeabilidade nos vasos tumorais comparados com vasos normais (SCAPPATICCI, 2002).

Na angiogênese induzida em células malignas, a carga tumoral começa a exceder seu suprimento sangüíneo pela necessidade de oxigênio e nutrientes que são requeridos pelas células tumorais para indução da angiogênese pela secreção de fatores angiogênicos ou recrutamento de outros tipos de células que ajudam neste processo. Recentemente, o foco de estudo tem sido a vascularização do tumor e componentes do estroma para melhor entendimento deste processo (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; KUNZ-SCHUGHART e KNUECHEL, 2002).

As células de melanoma são um tipo de tumor maligno 1 conhecido pela interação com o estroma circundante via fatores de crescimento, assim como interações célula-célula. O melanoma humano produz uma variedade de substâncias relevantes na indução da angiogênese, incluindo citocinas angiogênicas, componentes da matriz extracelular e metaloproteínases. Entretanto, há células malignas que não induzem angiogênese por si, mas pela manipulação de células do estroma (células epiteliais e fibroblastos) convergindo-as para construção de uma infra-estrutura vascular. Os fibroblastos como células predominantes no estroma, estimulam a passagem das proteínas da matriz para os novos tecidos. Os fibroblastos se comunicam com as células de melanoma via fatores de crescimento, citocinas e interações célula-célula. As células de melanoma têm mostrado a alteração na expressão da caderina, resultando na habilidade de se comunicar com fibroblastos enquanto ao mesmo tempo perde a comunicação com os queratócitos (GOLDSTEIN et al., 2005).

Observou-se que os fibroblastos de tecidos normais podem ter um efeito inibitório, anti-tumoral em células de mama pré-neoplásicas, enquanto fibroblastos derivados de tumor

conferem indução morfogenética e mitogênica em células de mama (SHEKHAR et al., 2001).

O uso de inibidores angiogênicos na terapia anti-câncer, após mais de 30 anos de teoria passou de pesquisa para realidade. A vasculatura adulta normal é geralmente quiescente na natureza, com células endoteliais se dividindo aproximadamente durante 10 anos. Em contraste, o crescimento tumoral requer um crescimento vascular constante e uma remodelação, a fim de que um tumor sólido cresça 1 a 2mm no seu tamanho. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores são reguladores chaves no processo de angiogênese, os quais fazem deles agentes terapêuticos atrativos. O VEGF como agente inibidor vem sendo alvo de estudo no tratamento de câncer (ROSEN, 2005).

A importância da angiogênese na tumorigênese é a de estudar possíveis terapias que sejam menos tóxicas e nocivas ao ser humano no tratamento de câncer, que possibilite uma intervenção segura e reduza a proliferação, invasão e migração celular do tumor. Essa investigação se baseia na pressuposição de que as células endoteliais suprem os tumores com a vascularização e, desta forma, são populações celulares estáveis que não alteram mesmo em eventos mutacionais das células tumorais. Estudos recentes apontam para o fato de que a vascularização do tumor é bastante anormal e que as células endoteliais que estão no canal dos vasos sanguíneos do tumor diferem em muitos aspectos da vascularização normal (McDONALD e FOSS, 2000).

Os vasos sanguíneos dentro de um dado tumor são heterogêneos e são sujeitos a influência do micro ambiente local e citocinas, tais como fator de crescimento de fibroblastos, interleucina 8 e interferon alfa, que são produzidos por células tumorais, macrófagos e outros tipos de células. Esse micro-ambiente do tumor pode variar bastante quando comparado com áreas centrais do volume tumoral, que podem ser hipóxia e necrótica, com mais áreas viáveis na periferia do tumor. Neste sentido, as células endoteliais dentro do tumor podem ser heterogêneas dentro de regiões diferentes do endotélio que são ativas, imaturas e proliferativas, em contraste com regiões onde as células endoteliais são quiescentes ou mesmo sofrendo processos apoptóticos (EBERHARD et al., 2000).

Terapias de câncer/ tratamentos quimioterápicos

A terapia convencional no tratamento de câncer é o uso de citotóxicos. Hoje vem se buscando alternativas, devido aos efeitos colaterais promovidos por estes agentes e também que levem ao aumento de sobrevida dos pacientes com esta doença (CARTER, 2000). Uma alternativa é o uso de agentes citoestáticos, como os inibidores de angiogênese, que podem estar associados aos citotóxicos e serem registrados como um agente único e também os agentes moleculares que agem na regulação do ciclo celular (CARTER, 2000).

A falta de regulação do ciclo celular leva ao estabelecimento do câncer causado pela diferenciação e crescimento aberrante. O ciclo celular é um processo de regulação fina e complexa que pode resultar em divisão, diferenciação ou crescimento, ou mesmo contribuir para a morte programada da célula, apoptose. A regulação própria envolve sinais que levam a ativação das quinases serina-treonina dependentes das ciclinas (CDK), reguladas pela ativação das ciclinas e inibidores de quinase dependente de ciclina (CKI) (CARTER, 2000). Um estudo sobre a avaliação *in vivo* da formulação micelar polimérica do paclitaxel foi realizado (KIM et al., 2001), a fim de verificar a toxicidade e eficácia. Ainda que a formulação clínica hoje utilizada (Taxol) tenha se mostrado clinicamente ativa para uma variedade de tumores, tem ela efeitos colaterais significativamente tóxicos, alguns associados a componentes da fórmula na mistura de 1:1 (v/v) do Cremophor EL e álcool desidratado. Um dos problemas do paclitaxel na administração intravenosa é sua solubilidade em água. Este estudo foi delineado para avaliar a farmacocinética, distribuição tecidual, toxicidade e eficácia do paclitaxel (Genexol) contendo sistema micelar polimérico biodegradável (Genexol- PM) em comparação ao Taxol. Em modelo de células de câncer humano, o Genexol-PM e o Taxol mostraram citotoxicidade comparáveis *in vitro* contra as células de ovário OVCAR-3 e de câncer de mama MCF7. O máximo de dose tolerável do Genexol-PM e Taxol em camundongos nude foi determinada em 60 e 20mg/Kg, respectivamente. A dose letal mediana (LD₅₀) em ratos Sprague-Dawley foi de 205.4mg/Kg (machos) e 221.6 mg/Kg (fêmeas) para o Genexol-PM, enquanto para o Taxol foi de 8,3mg/Kg (machos) e 8,8mg/Kg (fêmeas). Após a administração intravenosa do Genexol-PM em camundongos fêmeas C57BL/6J induzidas com o melanoma B16F10 na dosagem de 50 mg/Kg, a área da curva sobre a concentração plasmática *versus* tempo foi

similar ao Taxol na dosagem de 20 mg/Kg, mas a biodistribuição do paclitaxel após administração do Genexol-PM mostrou níveis 2 a 3 vezes maiores nos tecidos incluindo fígado, rins, baço, pulmão, coração e tumor quando comparado com o Taxol. A eficácia anti-tumoral do Genexol-PM *in vivo* foi medida pela redução do volume tumoral do SKOV-3 (câncer ovariano humano) implantado nos camundongos atímico *nude* e do câncer humano de mama MX-1 implantado no camundongo atímico Tac:Cr (NCr) foi significativamente maior que do Taxol. Os resultados de citotoxicidade, dose tolerável, LD₅₀ e eficácia anti-tumoral sugerem que o Genexol-PM pode apresentar uma grande vantagem sobre o quimioterápico hoje utilizado, o Taxol (KIM et al., 2001).

Em estudo de ROSEN (2005) foi avaliado o uso de agentes inibidores no tratamento de cânceres de mama, pulmão, e colo retal. O sucesso do uso da bevacizumab (tem como alvo todas as isoformas de VEGF, sendo aprovado como terapêutica) em fase III randomizado para o tratamento do câncer colorretal fez crescer a esperança que as terapias antiangiogênicas irão promover benefícios similares para o tratamento de outros tipos de tumores. Entretanto, estes resultados seguidos daqueles com pivotal (inibidor anti-angiogênico) estudo fase III em pacientes com câncer de mama, foram desapontadores. Estes inibidores apresentaram resultados muito distintos. Ambos os tipos de tumores apresentam altos níveis de VEGF, entretanto, como foi reportado para EGFR (receptor de fator de crescimento endotelial vascular) em câncer de pulmão, alta expressão pode não necessariamente correlacionar com a resposta dos agentes de alvo. Ainda, resultados recentes em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) têm demonstrado que mutações genéticas no EGFR correlacionaram com a resposta em agentes específicos de EGFR. É possível que, com o tempo, alguns marcadores preditivos similares possam ser identificados para terapias como aquelas baseadas em VEGF. Atualmente, uma grande varredura tem sido desenvolvida de compostos anti-angiogênicos. Os resultados provenientes destes estudos são necessários para demonstrar se a melhora nas taxas de resposta e sobre-vida podem ser atingidas para tipos específicos de tumores por fatores de inibição angiogênica diferentes. Entretanto, o conceito de inibição da angiogênese como uma modalidade de tratamento do câncer foi levantada a três décadas atrás e a busca de um caminho para a prática clínica é um processo de desenvolvimento lento. Dos resultados

positivos do bevacizumab no câncer de colo retal despertou entusiasmo pela renovação de agentes anti-angiogênicos, e finalmente no uso do tratamento como uma das opções na terapêutica do câncer (ROSEN, 2005).

Os inibidores da angiogênese diferem da quimioterapia convencional citotóxica, por atacarem as células normais ao invés das células tumorais, as quais contêm múltiplas mutações (CARTER, 2000).

O desenvolvimento clínico do inibidor angiogênico SU5416, uma pequena molécula inibidora do fator de crescimento endotelial vascular, está em curso. Na fase clínica I, SU5416 demonstrou uma atividade tanto em pacientes com câncer de colo retal como em câncer de pulmão de células não pequenas. Baseado nestes resultados encorajadores, estudos de fase III foram conduzidos para avaliar a combinação do SU5416 com uma terapia citotóxica já estabelecida (CARTER, 2000). O SU5416 é uma molécula pequena inibitória do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pela via Flk-1. Neste estudo foi concluído que mesmo havendo um risco na administração do SU 5416, este deve ser tomado devido a algumas razões: no estudo de fase I administrando 145mg/m^2 intravenoso (i.v.) duas vezes por semana foi bem tolerado em administração crônica; os níveis sanguíneos atingidos ficaram acima dos níveis requeridos para atividade pré-clínica; o espectro de toxicidade não sobrepôs com os citotóxicos; atividades clínicas e biológicas foram observadas em pacientes com câncer. Com estes dados, uma combinação lógica dos inibidores de angiogênese e citotóxicos (quimioterápicos convencionais) tem como estratégia o registro para uso em câncer de cólon e de pulmão com células não pequenas, como sendo um agente único de uso subsequente para o estudo de fase I. Os inibidores angiogênicos são talvez hoje o alvo mais interessante na terapia oncológica. O SU 5416 entra para registro nesta área, desta forma modificando o paradigma dos citotóxicos para ajustar a necessidade do desenvolvimento das drogas citoestáticas de uma maneira rápida e lógica (CARTER, 2000).

REFERÊNCIAS

1. Bornstein, P.; Sage, E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opin of Cell Biol.* 2002;14:608-16.
2. Bounous, G.; Letorneau, L.; Kongshavn, P.A. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. *Journal of Nutrition.* 1983; 113:1415-1421.
3. Brentani, M.M.; Coelho, F.R.G.; Kowalski, L.P. Bases da Oncologia. 2º Ed. Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmedd Editora. 2003.
4. Camargo, A.A.; Costa, F.F. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Brentani, M.M.; Coelho, F.R.G.; Kowalski, L.P. Bases da Oncologia. 2º Ed. Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmedd Editora. 2003.
5. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000, 407:249-57.
6. Carter, S.K. Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. *The Oncologist.* 2000, 5(suppl 1):51-54.
7. Carvalho, H.F.; Pimentel, S.M.R. Capítulo 19 - Matriz extracelular em: A célula 2001. 1ª. Ed. Ed. Manole; 2001.
8. Chambers, A.;F.; Matrisian, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Nat Cancer Institute* 1997; 89(17):1260-70.
9. Cho, M.K.; Suh, S.H.; Lee, C.H.; Kim, S.G. Bovine type I collagen inhibits Raw264.7 cell proliferation through phosphoinositide 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent down-regulation of cyclins D1, A and B1. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005, 1744:47-57.
10. Clemens, A.; Schmitt ; Jordan, S.; Fridman; Meng Yang; Soyoung Lee; Eugene Baranov; Robert, M.; Hoffman; Scott, W.; Lowe. A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*, Vol. 109, 335–346, May 3, 2002.
11. Coelho F.R.G. O controle do câncer. In: Brentani, M.M.; Coelho, F.R.G.; Kowalski, L.P. Bases da Oncologia. 2º Ed. Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmedd Editora. 2003.

12. Curran, S.; Murray, G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Europ J of Cancer* . 2000;36: 1261-630.
13. Dias, N.F.G.P. “Propriedades imunoestimulatórias e anti-tumoral de concentrados protéicos de soro de leite bovino, de caseína e de um isolado protéico de soja” Tese de Doutorado, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2004.
14. Eberhard, A.; Kahlert, S.; Goede, V. Heterogeneity of angiogenesis and blod vessels maturation in human tumors:implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000, 60:1388-1393.
15. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995, 1:27-31.
16. Geng, Y.; Whoriskey, W.; Park, M.Y. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E *Cell* 1999;97(6):767-77.
17. Goldstein, L.J.; Chen, H.; Bauer, R.J.; Bauer, S.M.; Velazquez, O.C. Normal human fibroblasts enable melanoma cells to induce anguogenesis in type I collagen. *Surgery.* 2005, 138:439-49.
18. Goodman, R.E.; Schambacher, F.L. Bovine lactoferrin in RNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. *Biochemical and Biophysical Research communications.* 1991; 180(1):75-84.
19. Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Fisiologia Médica.* vol 1:668-717, 10^a Ed., Guanabara Koogan S.A; Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
20. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000, 100:57-70.
21. Hartwell, L.H.; Weinert, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246(4930):629-34.
22. Hong, S.D. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000; 36: 207-13.
23. Instituto Nacional de Câncer (INCA). 2006.
http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=333
24. Jacobucci, H.B. “Características nutricionais e efeitos sobre lipídeos sanguíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados à caseína e

- proteínas de soja comerciais”. Dissertação de Mestrado, curso de Ciência da Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1999.
25. Jacobucci, H.B.; Sgarbieri, V.C.; Dias, N.F.G.P.; Borges, P.Z.; Tanicawa, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and proteins and liver cholesterol. *Nutrition Research*. 2001; 21: 905-915.
 26. Juhász, A. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypofaryngeal cancers. *Laryngoscope* 2000; 110: 84-92.
 27. Kim, S.C.; Kim, D.W.; Shim, Y.H.; Bang, J.S.; Oh, H.S.; Kim, S.W.; Seo, M.H. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release*. 2001, 72:191-202.
 28. Klose, A.; Hennes, A.W.; Zigrino, P.; Weber, E.; Krieg, T.; Mauch, C.; Hunzelmann, N. Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native collagen I induces the release of mature cathepsin B. *Int. J. Cancer*. 2006, 118:2735-2743.
 29. Koivisto, L. Integrins $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$ and $\alpha v \beta 6$ collaborate in squamous carcinoma cell spreading and migration on fibronectin. *Exp Cell Res* 2000; 255(1): 10-7.
 30. Kotch, F.W.; Raines, R.T. Self-assembly of synthetic collagen triple helices. *PNAS* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508783103. 2006, 103(9):3028-3033.
 31. Kowalski I.S.G.; Kowalski, L.P. Prevenção do cancer. In: Brentani, M.M.; Coelho, F.R.G.; Kowalski, L.P. Bases da Oncologia. 2º Ed. Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmedd Editora. 2003.
 32. Kritchevsky, D. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *British Journal of Nutrition*. 2000; 83(5):459-65.
 33. Kunz-Schughart, L.A.; Knuechel, R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol*. 2002, 17:599-621.
 34. Malumbres, M.; Barbacid, M. To cycle or not cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews Cancer* 2001;1:222.
 35. Manela-azulay; Mônica; Mandarin-de-Lacerda; Carlos Alberto; Perez; Maurício de Andrade. Vitamin C. *An. Bras. Dermatol*. 2003;78(3):265-272.

36. Mangone, F.R.R.; Federico, M.H.H. Ciclo celular. In: Brentani, M.M.; Coelho, F.R.G.; Kowalski, L.P. Bases da Oncologia. 2º Ed. Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmedd Editora. 2003.
37. Marshall, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. *Alternative Medicine Review* 2004; 9(2):136-156.
38. Maubois, J.L.; Olivier, G. Extraction of milk proteins. In: *Food Proteins and their Applications*. (Eds.) Dekker, Inc, NY, CH, p. 579-595, 1997.
39. McDonald, D.M.; Foss, A.J. Endothelial cells of tumor vessels: Abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev.* 2000, 19:109-120.
40. McGowan, C.H. Regulation cell cycle. In: Meijer L, Jezequiel A, Roberge M, eds. *Progress in cell cycle research*. 2003, 1-4.
41. McIntosh, G.H.; Royle, P.J.; Leleu, R.K.; Regester, G.O.; Johnson, M.A.; Grinsted, R.L.; Kenward, R.S.; Smither, G.W. Whey protein as functional food ingredients. *International Dairy Journal*. 1998;8: 425-434.
42. Melo, F.H.M.; Junqueira, M.S.; Chammas, R. Mecanismos de invasão e metástase. In: Brentani, M.M.; Coelho, F.R.G.; Kowalski, L.P. Bases da Oncologia. 2º Ed. Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmedd Editora. 2003.
43. Miranda, J.L. Expressão de proteínas da matriz extracelular em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua. 2002, 119f. Tese (Doutorado em Patologia Oral). Departamento de Odontologia da UFRN, Natal-RN.
44. Moreno, Y.M.F. Influência das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Dissertação de mestrado, Curso de Ciência da Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2002.
45. Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-91.
46. Morris, E.J.; Dyson, N.J. Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res* 2001;82:1-54.

47. Nabeshima, K. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52: 255-64.
48. Nigg, E.A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001, 2(1):21-32.
49. Pasco, S.; Brassart, B.; Ramont, L.; Maquart, F.X.; Monboisse, J.C. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. *Cancer Detection and Prevention.* 2005, 29: 260-66.
50. Rich, A.M.; Read, P.C. Epithelial-mesenchymal interactions in experimental oral mucosal carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30: 389-97.
51. Rosaneli, C.F. “Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos “. Dissertação de Mestrado, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2002.
52. Rosaneli, C.F.; Bighetti, A.E; Antônio, M.A; Carvalho, J.E.; Sgarbieri, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions, caused by ethanol ingestion. *Journal of Medical Food.*2002; 5(4): 221-228.
53. Rosen, L.S. VEGF-Targeted Therapy: Therapeutic Potential and Recent Advances. *The Oncologist.* 2005;10:382–391
54. Roth, J.M.; Caunt, M.; Cretu, A.; Akalu, A.; Policarpio, D.; Li Xiaolu; Gagne, P.; Formenti, S.; Brooks, P.C. Inhibition of experimental metastasis by targeting the HIUV26 cryptic epitope in collagen. *American Journal Pathology.* 2006, 168(5):1576-1586.
55. Sandal, T. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist* 2002;7:73-81
56. Scappaticci, F.A. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *Journal Clinical Oncology.*2002, 20(18):3906-3927.
57. Schwartzman, R.A.; Cidlowski, J.A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews.* 2006; 14 (2):133-151.

58. Sgarbieri, V.C. Food proteins and peptides presenting specific protection to human and health (a review). In: Food for health in the Pacific Rim. Eds: Whitaker, JR; Haard, NF; Soemaker, CF; Singh, RP. Food and nutrition Press Inc., p. 335-363, 1999b.
59. Sgarbieri, V.C. The role of dietary energy and macrocomponents of food in modulating carcinogenesis (an overview). *Ciência e Cultura*.1999a; 51(2), 104-121.
60. Sgarbieri, V.C.; Pacheco, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos (revisão). *Brazilian Journal of Food Technology*.1999; 2(1/2): 7-19.
61. Sgarbieri, V.C.; Rangel, H.Á.; Zinsly, P.F.; Pacheco, M.T.B.; Dias, N.F.G.P. Novel nutritional and physiological functions of milk proteins. In: Annals IV World Conference of Food Science and Technology, Wuxi, China, 2000.
62. Sheaff, R.J.; Groudine, M.; Gordon, M. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 1997;11(11):1464-78.
63. Shekhar, M.P.; Werdell, J.; Santner, S.J. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res*. 2001, 61:1320-6.
64. Soussi, T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000;60(7):1777-88.
65. Teodoro, J.G.; Parker, A.E.; Zhu, X.; Green, M.R. p53-Mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. 2006, 313 (Aug): 968-971.
66. Thomas, G.T.; Lewis, M.P.; Speight, P.M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999; 35: 227-33.
67. Velazquez, O.C.; Snyder, R.; Liu, Z.J. Fibroblasts-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *Faseb J*. 2002, 16:1316-8.
68. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003, 36: 131-149.

69. Waard, R.D.; Belzen, N.V. The anti-carcinogenic potential of lactoferrin. *AgroFood Industry Hi-Tech*.2003; March-April.
70. Wall, S.J.; Werner, E.; Werb, Z.; DeClerk, Y.A. Discoidin domain receptor 2 mediates tumor cell cycle arrest induced by fibrillar collagen. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280 (48): 40187-40194.
71. Wernert, N. The multiple roles of tumor stroma. *Virch Arch* 1997; 430: 433-43.
72. Westermarck, J.; Kahari, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB J*. 1999; 13:781-91.
73. Wilson, D.F. Oral cancer: role of basement membrane in invasion. *Aust Dent J*. 1999; 44(2):93-7.
74. Yamaguchi, T.P.; Dumont, D.J.; Conlon, R.A. Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 1993, 118:489-498.
75. Yves, A.;Derderck. Proteases, Extracellular matrix and cancer. *Am J of Pathol*. 2004; 164(4): 1131-9.
76. Zörnig, M.; Hueber, A.O.; Baum, W.; Evan, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001, 1551:F1-F37.

CAPÍTULO II: PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ESTUDOS POSTERIORES

ARTIGO 1: "Composition, Membranes and Chromatographic Fractionation and Mass Spectra Characterization of Collagen Hydrolysates".

A ser publicado no Journal of Chromatographic Science

Composition, Membranes and Chromatographic Fractionation and Mass Spectra Characterization of Collagen Hydrolysates.

Geórgia A. Castro,¹ Said Bouhallab,² Daniel Mollé,² Peter Reiter,³ Edson Yajima,⁴ Valdemiro C. Sgarbieri,¹

¹State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Biochemistry and Biophysics Laboratory, Institute National des Recherche Agronomique, INRA, Rennes, France.

³Gelita Europe, Gelita Group, Eberbach, Germany.

⁴ Gelita South America, Gelita Group, Maringá, Brazil

Fractionation and Characterization of Collagen Hydrolysates

Key words: collagen, physico-chemical, reverse-phase chromatography, mass spectrometry, fractionation

ABSTRACT. Biologically active peptides have been identified in enzyme hydrolysates of various food proteins, including the milk proteins α -, β and κ -caseins, collagen and whey proteins. Therefore, the main purpose of this investigation was an attempt to disclose fractions of hydrolysates and regions of the collagen molecule capable of inhibiting reproduction and /or development of the melanoma B16F10 cells, both *in vitro* and *in vivo* experiments. Fractionation using micro- and ultrafiltration, and reverse phase chromatographic techniques were used to obtain the fractions from the sample BCH-P1, which presented the highest activity against B16F10 melanoma tumor cells. The physical and physicochemical characterization and mass spectra characterization were also conducted. Basic physicochemical composition, degree of hydrolysis, amino acid profile, ammonium content (total and free) and isoelectric focusing were determined in order to detect differences among the fractions obtained from micro- and ultrafiltration. Gel permeation chromatography showed mean molecular mass for all fractions varying according to membranes used. The isoelectric focusing from the hydrolyzed proteins presented a broad characteristic profile. Total ammonium content and degree of amidation were much higher for porcine collagen hydrolysate samples compared with bovine. Mass spectra indicated peptide sequence for F1 and F2 fractions, obtained from reverse phase chromatography. These peptides sequences presented a marked predominance of the amino acid glycine.

Introduction

Biologically active peptides have been identified in enzyme digests of various food proteins, including the milk proteins α -, β and κ - caseins (1). Bouhallab (2) reported the first application of the process using continuous stirred tank membrane reactor for continuous separation of bioactive peptides. From the data obtained, it appeared that continuous isolation of specific peptide (s) from reaction mixture requires: use of a highly specific enzyme; rapid release of the desired peptide; large molecule mass difference between bioactive peptides and others to promote selective separation; high transmission rate of bioactive molecule through the ultrafiltration (UF) membrane.

Collagen is an important constituent of the supporting structures of both vertebrates and invertebrates. In the mammal it is generally the most abundant body protein constituent of skin, tendon, cartilage, bone and connective tissue (3). Some authors demonstrated nineteen types of collagen, and others only fourteen (4). The collagen types found in skin are predominately types I and III, for cartilage type II (4). When solutions of collagen are heated at about 40°C or above, denaturation occurs and the helical structure is lost (5,6). In the present study bovine and porcine skins were used to prepare collagen hydrolysates.

Examination of the collagen products in the ultracentrifuge showed that two main components α and β were obtained, the β with a molecular mass two fold larger than α . Most recent values reported for molecular mass of the α component were between 91,000 and 95,000 Da. Another component γ , which sediments

faster than β and has a molecular weight similar to that of the tropocollagen molecule can also be separated (5,6). The two α components, designated $\alpha 1$ and $\alpha 2$ differed in amino acid composition (7).

The enzymatic substrate specificity leads to hydrolysates with different properties. Trypsin presents specificity for Arg and Lys from N-terminal end, chymotrypsin for Tyr from C-terminal end and the CNBr reagent is specific for Met from N-terminal end. There are other proteolytic enzymes with different specificity. Depending on pH, temperature, concentration, ionic strength and all conditions in which the substrate and enzyme is exposed, the hydrolyzed product will present different size of chains and interaction among them (8). Some proteases act better in alkaline pH, but do not present any specificity to break the polypeptide chain, generating hydrolyzed products very difficult to be characterized.

The complete amino acid sequence of the 914-residue-pepsin fragment, $\alpha 1(\text{IV})95$ from the $\alpha 1$ chain of human placental basement membrane (type IV) collagen was reported (9).

The sequence Gly-Pro-Hypro appears as a repeating sequence, even in different types of collagen (types I, III and V) in the chains $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (10). This similarity in collagen chains promotes more non-specific regions to be identified as responsible for some defined bioactivity.

The collagen type I presents preferably hydrogen bonds between its chains, but collagen type III presents disulfide bonds between cysteine amino acids in the tropocollagen region of the chain, which stabilizes the collagen structure (4, 10).

The cDNA and protein sequences of the N-terminal half of human basement membrane collagen (type IV) have been determined (11). Overlapping cDNA clones were constructed by repeated primer extension with synthetic oligonucleotides. At the protein level, the sequence of the cyanogen bromide peptide CB6 adjacent to the 7S domain has been additionally elucidated. The data presented (11) completed the protein sequence and nearly the entire cDNA sequence of the human $\alpha 1(\text{IV})$ chain.

In the present study the partial characterization of bovine and porcine skins collagen hydrolysates was attempted by the use of membranes micro- and ultrafiltrations, gel permeation chromatography-HPLC, isoelectric focusing and RP-HPLC chromatography-mass spectrometry.

The main purpose of this investigation was an attempt to disclose fractions of hydrolysates and regions of the collagen molecule capable of inhibiting reproduction and /or development of the melanoma B16F10 cells, both *in vitro* and *in vivo* experiments, which was done in subsequent investigations.

Experimental

Samples

Collagens hydrolysates were obtained from bovine (lot 40701; BCH) and porcine (lot EH 4517 ;PCH) skin raw materials supplied by Gelita Group (Gelita South America), Cotia, São Paulo, Brazil.

Samples preparation for the studies

Fractionation. The starting materials were ultra-filtrated using kit of membranes from WGM with different membrane cut off: first membrane KOCH number 180 (4439-5 S4-M) cut off= 50KD-80KD; second membrane KOCH number 131 (KM824936 3022N) cut off= 5KD-8KD; third membrane KOCH number 328 (KM830532-3003V) cut off= 1KD-2KD. Solutions at 25 % concentration of bovine and/ or porcine collagen hydrolysates were prepared and passed through these three membranes taking the permeate from the first membrane and passing through the next membrane (second) and for the third membrane the same procedure was conducted, following with the second permeate to ultrafiltrate in the third membrane. Therefore, three permeates (P1, P2, P3) were obtained from both bovine or porcine collagen hydrolysates. Hydrogen peroxide was added (600ppm) to the permeates to preserve them until the time of spray drying. Prior to drying, the hydrogen peroxide was decomposed using a catalase solution from Novo Nordisk.

Final permeates were designated: BCH-P1/ PCH-P1 (80-50 KDa); BCH-P2/ PCH-P2 (8-5 KDa) and BCH-P3/ PCH-P3 (2-1 KDa).

Molecular sieve fractionation. The permeate of bovine collagen hydrolysate obtained in the first KOCH membrane (BCH-P1) was selected to be fractionated using AMICON membranes ULTRA-4 (50; 30; 10; 5; 3 KDa cut off) from Millipore. Solution of 2 % of BCH-P1 was prepared and was passed through these five AMICON membranes taking the permeate from the first membrane (50KDa) and passing through the next (30KDa) membrane (second) and subsequently to all other membranes. The retentates R1 (>50KDa), R2 (<50>30KDa), R3

(<30>10KDa), R4 (<10>5KDa), R5 (<5>3 KDa) and the last permeate P5 (<3KDa) were collected. All the collected samples were freeze-dried for further studies.

Basic chemical characterization. Dry extract and moisture content (12, 13) ; protein content (12, 13) determination was based on Kjeldhal methodology using for collagen the conversion factor 5.5; non-protein nitrogen (13); ash content (12) and ammonium content was also determined: the hydrolysate was treated with 0.5 mL sulfuric acid for 4 hours at 105°C. Subsequently the content of ammonia was determined by an enzymatic test kit (Boehringer Mannheim/ R-Biopharm, UV method, Cat.No. 11 112 732 035). In addition the ammonium content in the untreated hydrolysate was determined. The difference between both values estimate the amino acid amide content. Calculated as mmol/g the degree of amidation in the hydrolysate could be found. The theoretical value of the total glutamic acid and aspartic acid content, known from literature and previous amino acid analysis, is 1.12 mmol/g (Glu: 0.71 mmol/g + Asp : 0.41 mmol/ g).

Determination of degree of hydrolysis. The methodology was adapted and adjusted for collagen hydrolyzed samples from the method proposed in the literature (14). The degree of hydrolysis (DH%) is defined as the number of broken peptide linkages divided by the total peptide linkages. The DH (%) can be measured using TNBS (2,4,6 trinitrobenzenesulfonic acid dihydrate) reaction. Primary amines form chromophore with TNBS under alkaline conditions and this reaction is interrupted when the pH is decreased. This reaction quantitates amino groups released during the hydrolytic reaction.

The equation to calculate DH (%) using TNBS is:

$$ABS=a \times [] +b$$

$$DH=h/h_{tot} \times 100$$

where:

x=signal of multiplication

h= is the number of hydrolyzed bonds

h_{tot}= is the total number of peptide bonds per protein equivalent

DH= the percentage of cleaved peptide bonds.

Amino acid determination. Amino acids composition was determined after acidic hydrolysis at 110°C using closed tubes submitted to vacuum condition for 24-96 hours (15). The determination was conducted using reverse phase chromatography (column C₁₈, 100Å, 5μ, 250 x 4.6mm) using phenylisothiocyanate (PITC) to derivatize the amino acids from acid hydrolysis , in order to form PTC-amino acid derivatives. The detection is made after RP-HPLC (linear binary gradient pH 6.4 , running 1mL/min and column temperature at 58°C) at 254nm. The buffer A used was sodium acetate 0.14N, acetonitrile 0.14N and triethylamine 0.14N and buffer B is acetonitrile in water Milli-Q at 6:4 ratio.

The tryptophan content determination was conducted by using the colorimetric reaction with p-dimethylaminobenzaldehyde (PAB) of hydrolyzed samples using the enzyme pronase and measurement at 590nm (16).

Determination of molecular weight distribution. Peptide mixtures (bovine or porcine collagen hydrolysates) resulting from fractionation using KOCH

membranes were initially fractionated on TSK 2000 (G2000SW, 13 μ m, 125Å; 2.15 x 30cm) column equilibrated at 20°C in sodium phosphate buffer at pH 5.3. The columns were run at 0.5mL/min. Column eluent was monitored at 214 nm using a filter detector. It was injected 20 μ L of sample solution at 2% concentration in benzoic acid 0.01%.

Isoelectric focusing characterization using PAGE-SDS. Using eletrophoresis technique and staining with Coomassie Blue at 50°C for 30 minutes. For isoelectric focusing, electrode wicks long size- SERVA number 42987 and filter cardboard (240 mm x 6mm x 1mm) were used. Anode fluid 3 and catode fluid 10 were also used in an equipment Multifor. Marker with different pI was Servalyt (amphoteric markers from pH 2.0 to pH 11.0). To run the samples 2000V, 14 mA, 14Watts was applied for 75 minutes.

Characterization of peptides using reverse phase-HPLC. This methodology was conducted using analytical and preparative columns of reverse phase chromatography in HPLC, in order to identify and separate the peptides which presented hydrophobic characteristic from those more hydrophilic and also to collect collagen fractions to be analyzed in mass spectrometer. Therefore, it was collected four fractions from RP (reverse phase preparative chromatography). The analytical C₁₈ column used was Vydac TP-RP 5215; 2.1mm x 15cm. Solvent A was water 1.06% trifluoroacetic acid (TFA) and B 80% acetonitrile in water 1.0% TFA. The column was thermostated at 40°C and a flow rate of 0.25mL/min was used throughout. The sample was eluted at 3mg/mL in buffer A, injected 30 μ L.

Step gradient of 5 minutes was done starting with 100% of buffer A until achieving 60% and buffer B starting with 0% until 40%, the last running minutes 80% of buffer B was used to clean up the column. The total running time was 51 minutes. HPLC used was an Alliance Waters 2487 equipped with a variable wavelength detector, at 214nm and an automatic sample injector.

The preparative C₁₈ column used was Prep Nova Pak HRC18 Waters (WAT 038528), 6µm, 60Å; 25 x 10 mm. Solvent A was water 1.06% trifluoroacetic acid (TFA) and B 80% acetonitrile in water 1.0% TFA. The column was thermostated at 40°C and a flow rate of 30mL/min (56bar) was used throughout. The sample (1mL) was eluted at 200mg/mL in buffer A. Step gradient of 5 minutes was done starting with 100% of buffer A until achieving 60% and buffer B starting with 0% until 40%, the last running minutes 80% of buffer B was used to clean up the column. The running time was 51 minutes. The software used was EZCHROM. HPLC used was a Dynamax equipped with a variable wavelength detector, reading at 214nm and a manual sample injector. Fractions were collected by hand.

Mass spectrometry. The mass spectrometry is based on analysis of molecules ionized in gas phase. The measurement was conducted using mass/charge (m/z) of molecular ions or fragments generated. In this way it is possible to determine the molecular mass of components under study.

According to determination previously made at the Institute Nationale des Recherches Agronomique (I.N.R.A.), the spectrometer used was RP/MS (Quadrupole and Electro-spray –Star XL ESI). For RP-HPLC the methodology

mentioned above used a column C₁₈. The collagen hydrolysate was separated in hydrophylic phase more than in hydrophobic (until 40% of buffer B).

Statistical analysis. Basic chemical characterization, degree of hydrolysis and amino acid profile, and all measurements which were performed were compared by one-way analysis of variance. Differences were expressed by $p < 0.05$. Differences in basic chemical composition (protein content, moisture content) were tested for statistical significance, using analysis of variance and differences among means by the Duncan's or the Tukey's test at $p < 0.05$. All the experimental data were expressed as mean $\pm$ sdm.

Results and Discussion

The results of chemical and physicochemical characterization of the bovine and porcine hydrolysates and hydrolysate fractions will be presented and discussed.

Basic chemical characterization. Table I presents the percentage composition of the original bovine and porcine collagen hydrolysates (BCH/ PCH) and of their fractions (P1, P2, P3) from KOCH membranes fractionation. Bovine samples presented moisture content from 5% to 3% and porcine samples from 7.2% to 4.6%. The protein content also varied from 96.2% to 93% for bovine samples and from 95.1% to 90% for the porcine. The production lots BCH (40701) and PCH (EH4517) presented as specification "not lower than 90% protein". The lipid content was low in all samples, from 0.05% for original samples to 0.03% for

all the bovine and porcine fractions. The ash contents were also low varying from 0.4% to 0.2% and the only sample presenting 0.4% ash content was BCH. The carbohydrate contents were estimated by difference.

Protein content and soluble protein were also analyzed in various samples. For BCH, the total protein was 95.02% and soluble protein (15% TCA) was 86.41%, therefore, only 8.61% referred to insoluble proteins indicating larger peptides. For BCH-P1 the total protein was 96.98% and soluble protein (small peptides) 91.40%, so only 5.58% was insoluble peptides in 15% TCA solution. These suggested that the samples presented peptides with low number of amino acid residues and due to high glycine and absence of the sulfurous amino acids, cystine and cysteine, hydrophobicity was very low. The native collagen does not present the amino acids residues, cystine and cysteine, but synthetic collagen presented shorter fragments in which the three strands are held in a staggered array by disulfide bonds (17).

Insert Table I.

Free and total ammonium content. The alkaline pre-treatment which the collagen hydrolysates are submitted causes hydrolysis of amide groups of collagen that does not happen in acid treatment. The alkaline hydrolysis converts asparagine and glutamine to aspartic acid and glutamic acid, respectively. This conversion changes the isoelectric point of the collagen hydrolysate toward lower values. Arginine also could be converted to ornithine and/ or citruline, releasing ammonium. The amount of ammonium is related to the hide conditioning, the longer it is the more ammonium is formed. In the presence of glutamate

desidrogenase (GDH) and NADH, the ammonium reacts with 2-oxoglutarate to produce L-glutamate. The amount of NADH is the same as the ammonium content measured at 340 nm (3). The total ammonium content is the sum of free ammonium and bound ammonium, which is released by deamidation (Figure 1). The porcine skin raw material is submitted only to acid conditioning before being extracted and further submitted to enzymatic hydrolysis. On the other hand, bovine skin raw material is submitted to alkaline and acid conditioning before extraction and enzymatic hydrolysis. This alkaline conditioning, sometimes is done with a liming treatment which promotes deamidation of glutamine and asparagine. The isoelectric range of bovine collagen is lower around pH5.0-5.2 than porcine collagen, which is around pH8.5-9.2 (3). It is clearly noticed that total ammonium of porcine collagen hydrolysates is much higher than the bovine collagen hydrolysates. The degree of amidation (content of the amide glutamine and asparagine) is an indirect proof for any alkaline pre-treatment during the production process of collagen hydrolysates. As expected the bovine hydrolysates show a significantly lower degree of amidation than the porcine hydrolysates.

Insert Figure 1.

Degree of hydrolysis. Bovine samples achieved from 8.5% to 7.6% degree of hydrolysis and porcine samples from 7.9% to 6.6%. Compared with other protein hydrolysates, such as whey protein concentrates (WPC) extensively hydrolyzed, reaching degree of hydrolysis (DH) around 2.5-2.75%, the collagen hydrolysates should still support some degree of molecular unfolding. The non-aggregated hydrolysates of β -lactoglobulin and α -lactoalbumin remained unaffected up to

about 4% DH (18). In this study (18), limited proteolysis of whey protein by papain at pH 6.5 and subsequent thermal unfolding at acidic pH were studied. The degree of hydrolysis (DH) for functionality was about 3.0%, characterized by a significant reduction of aggregated whey protein present in commercial ultrafiltered WPC. The more acidic treatment favored a better solubility of aggregated protein at very low DH (18).

Amino acid profile. Collagen protein does not present significant amounts of tryptophan, cystine and/ or cysteine amino acid residues. The significant amino acids present in both bovine and porcine collagen hydrolysates are glycine, proline and hydroxyproline, this last one was not measured separately but as a proline.

The idea that the primary sequence of a polypeptide chain carries information for higher levels of structure is well established. The basis of the triple-chain helical structure of the collagen molecule can be understood in terms of glycine at every third position in the sequence and high content of proline and hydroxyproline. The glycine permit triple-chain packing and the imino acids, proline and hydroxyproline, direct the individual chains into a polyproline II-type helix (19). Major collagen of higher animals has two kinds of chains: α -1 and α -2, with different sequence, but homologous (20, 21). Residues 403-1011 in a triplet region and the 25th. residues in the C-terminal non-helical region derived from cyanogen bromide peptides α -1CB-3, α -1CB-7 and α -1CB-6 from calf skin collagen (22). In the present study 17.9% to 20.7% glycine, 13.8% to 16.36% proline and 9.06% to 10.3% alanine was determined, as shown in Table II. The tryptophane content varied from 0.06% to

0.33% considering all samples analyzed, which is also demonstrated in collagen type I for both α -1 and α -2 chains (23). The amino acid compositions were similar to those of other gelatins from various sources, including the characteristic composition of type I collagen (3, 9, 24).

Insert Table II.

Isoelectric focusing determination. Figure 2A shows the bovine samples isoelectric pH range, which varied from 4.6 to 7.2 and Figure 2B the isoelectric pH ranged from 6.6 to 8.6 for porcine collagen hydrolyzed samples. The hydrolyzed samples show a broad and non-defined pI range, also found for other protein hydrolysates, as whey and casein hydrolysates (18). As the molecular masses of the fractions reduced, concentrations of the bands were also reduced.

Insert Figure 2A and 2B

Gel permeation chromatography (GPC) – HPLC. The molecular weight profiles found in gel permeation chromatography was in accord with the cut off of the membranes used in the fractionation. Mean molecular masses found were BCH 3.0KDa; BCH-P1, 2.5KDa; BCH-P2, 1.7KDa and BCH-P3, 1.4KDa. Porcine samples presented lower mean molecular mass than bovine samples, and PCH-P1 did not differ from PCH. PCH and PCH-P1 mean molecular mass was 2.2KDa, PCH-P2, 1.6KDa and PCH-P3, 1.4KDa. The profiles found in Figure 3A and 3B showed that BCH, BCH-P1, PCH and PCH-P1 presented molecular masses distribution more spread with fractions of molecular masses 7.5 and 3.5KDa. On the other hand, the samples BCH-P2, BCH-P3, PCH-P2 and PCH-P3 presented

molecular masses distribution more concentrated around 1.5KDa. The profiles found for bovine and porcine samples were the expected as already reported in the literature (9).

Insert Figure 3A and 3B.

Reverse phase – mass spectrometric analysis. From reverse phase chromatography (Table III and Figures 4, 5, 6 and 7A,B) four fractions were collected: F1, F2, F3 and F4 with different hydrophobicity, F1 less hydrophobic and F4 more hydrophobic. Mass spectrometric analysis was applied to identify some peptides which correlated with bioactive peptides (data not shown).

Insert Table III

The fractions which presented the best biological response were F1 and F2. For fraction F1 the highest intensity (peak of molecular mass) was 744 daltons ($M+H^+$) corresponding to the primary sequence number 73 to 80 of peptide sequence. The proposed amino acid composition and sequences are: GMKGQPGA or VALRSQA based on protein sequence data base (10). For fraction F2, the highest intensity (peak of molecular mass) was 879.8 daltons ($M+H^+$). Therefore, this peak might have fragmented into other small peaks, which was suggested a probable sequence from 223 to 232 of the primary amino acid sequence of collagen, 40% G; 10% L; 30% P; 10% E and 10% T (PGLGEGLPGT) (1, 2, 3, 9, 10,11). This sequence seems to repeat in different parts of the collagen molecule at different proportions. The sequence found (9) for collagen type IV, α -1 chain contains 12 interruptions of the collagenous triplet sequence Gly-Xaa-Yaa

which varied in length from 1 to 11 residues. In our study the sequence proposed for F2 also presents this collagenous triplet sequence GLP (Gly-Leu-Pro).

Evaluating Figure 4B it can be found molecular masses from 429Da to 1379.9Da ($M+H^+$), considering the majority of peaks around 550 and 990Da. The second peak considering intensity was 429.3Da ($M+H^+$) and the third was 811.5Da ($M+H^+$). This mass spectrum identified twenty-three peptides presenting a mean molecular mass around 820Da.

Figure 5B twenty-three peaks corresponding to molecular masses from 415 to 1259.8Da ($M+H^+$) were also identified, presenting a mean molecular mass around 790Da. The profile showed in Figure 5B is broader than one presented in Figure 4B, but even though the mean molecular mass is similar.

The fraction F3 (Figure 6B) presented 29 peaks from 429.3 to 1455Da ($M+H^+$) achieving a mean molecular mass around 830Da presenting. On the other hand, Figure 7B presented only 12 molecular mass peaks with a mean molecular mass of around 690Da. Probably, the common sequence found in all four fractions presents glycine as could be found in the literature (10, 25) and in type IV collagen with known sequence (9, 11).

The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides presented also fragments arising from the third step of serial proteases treatment, which were composed of peptides ranging from 0.9 to 1.9 kDa. Two catalytically active peptides were separated by the consecutive chromatographic methods including gel filtration, ion-exchange chromatography, and reverse-phase high performance liquid chromatography. The isolated peptides were composed of Gly-Pro-Leu and

Gly-Pro-Met. These results suggested that Gly-Pro-Leu would be useful as a new anti-hypertensive agent (25).

Antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Allaska Pollack skin were isolated using consecutive chromatographic methods. Two peptides which showed strong antioxidative activity were composed of 13 and 16 amino acids residues, and both peptides contained Gly residue at the C-terminus and the repeating motif Gly-Pro-Hyp (26).

The cyanogen bromide hydrolysate $\alpha 1(\text{IV})95$, which is a pepsin fragment from human placenta obtained by using a two-step digestion followed by a separation by molecular sieve column HPLC, was separated on Sephadex G-75 superfine. Each fraction was rechromatographed using reverse-phase HPLC producing 15 peptides (CB1 to CB15) with unique N-terminal sequences (9). This pepsin fragment, $\alpha 1(\text{IV})95$, presented 302 glycine residues. Fragments CB2 to CB8 presented from 50 to 18 glycine residues per peptide, the other CB fragments presented lower number of glycine residues. CB fragments present 66 residues of glutamic acid and 71 residues of proline for collagen $\alpha 1(\text{IV})95$. For hydroxyproline there were 128 residues for $\alpha 1(\text{IV})95$, but CB2 and CB3 presented only 26 and 20 residues per peptide, respectively. The other CB fragments presented lower number of hydroxyproline residues per peptide. The amino acids which were present in CB fragments and $\alpha 1(\text{IV})95$ at higher number of residues per peptide were glycine, hydroxyproline, proline and glutamic acid, followed by hydroxylysine and leucine. This same order of higher residues of amino acids was found for thermolysin- and

trypsin-derived peptides of $\alpha 1(IV)95$. To identify approximately 90% of the sequence of collagen type IV α -1 chain, cyanogen bromide, thermolysin and trypsin cleavage were applied, and to separate the peptides reverse phase chromatographic techniques and gel permeation were used (9).

In the present study the original bovine and porcine collagen hydrolysates samples were produced by hydrolysis of non-specific alkaline protease, which did not allow identifying the site of collagen chain that was cleaved.

The use of reverse phase chromatography provided similar profile already found by Babel et al. (9, 11). On the other hand, sample analyzed by Babel et al. (9, 11) differed greatly from the samples used in this study.

Insert Figures 4A,B; 5A,B; 6A,B; 7A,B.

Conclusion

In this study, the HPLC-MS analysis method for collagen derivates was established. By this method, four fractions were obtained and each one was characterized according to molecular mass. The proposed peptide sequences were suggested for two fractions, showing that glycine and proline were the most present residues. The collagen derivates samples were also physico-chemically characterized and bovine collagen hydrolysate differed from porcine mainly in isoelectric focusing and ammonium content (degree of amidation).

Acknowledgment

The authors thank the Corporate R&D Department and adviser, Dr. Werner Badziong for making available the facilities, at Gelita laboratory in Eberbach, Germany, Edson Yajima for basic chemical characterization analysis, Dr. Ivo Lebrun from Institute Butantan, SP, Brazil for laboratory facilities, Peter Reiter, Alexander Hansal and Simone Walter for electrophoresis, GPC analysis and determination of ammonium content, and pos-graduate students from INRA for helpful guidance in laboratory techniques. This research was supported by Gelita South America, Cotia, SP, Brazil.

LITERATURE CITED

- (1) S. Bouhallab, D. Mollé, J. Lèonil. Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnology Letters*. 14 (9): 805-810 (1992).
- (2) S. Bouhallab, D. Mollé, J. Lèonil. Continuous hydrolysis of β -casein in a membrane reactor: preparation of a bioactive peptide. *Biotechnology Letters*. 15(7): 697-702 (1993).
- (3) A. Courts, A.G. Wards. *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press. London, 1977.
- (4) H.F. Carvalho, S.M.R. Pimentel. *A Célula 2001*, Editora Manole. 2001.
- (5) A.H. Kang, Y. Nagai, K.A. Piez, Gross. *J. Biochemistry* 5:509, 1966. In: Hulmes, D.J.S.; Miller, A.; Parry, D.A.D.; Piez, K.A.; Galloway, J.W. Analysis

- of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* 79: 137-148 (1973).
- (6) K.A. Piez, H.A. Bladen, J.M. Lane, E.J. Miller, P. Bornstein, W.T. Butler, A.H. Kang. Brookhaven *Symp Biol.* 21; 1968. In: D.J.S. Hulmes, A. Miller, D.A.D. Parry, K.A. Piez, J.W. Galloway. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* 79: 137-148 (1973).
 - (7) K.A. Piez, M.S. Lewis, G.R. Martin, Gross. *J. Biochim. Biophys. Acta.* 53:596; 1961. In: D.J.S. Hulmes, A. Miller, D.A.D. Parry, K.A. Piez, J.W. Galloway. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* 79: 137-148 (1973).
 - (8) O.R. Fenema. *Food Chemistry*, Marcel Dekker, Inc. New York. 1996.
 - (9) W. Babel and R.W. Glanville. Structure of human-basement-membrane (type IV) collagen complete amino acid sequence of a 914-residue-long pepsin fragment from the $\alpha 1(\text{IV})$ chain. *Eur. J. Biochem.* 143: 545-556 (1984).
 - (10) www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de. Search: bovine collagen; CO1A2_BOVIN (P02465), CO3A1_BOVIN (P04258); released May 30, 2000.
 - (11) D. Brazel, I. Oberbäumer, H. Dieringer, W. Babel, R.W. Glanville, R. Deutzmann, K. Kühn. Completion of the amino acid sequence of the $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non-

- triplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur. J.Biochem.* 168: 529-536 (1987).
- (12) *AFNOR*, 1971; Norme NF-V-04-211. Lait – Determination de la teneur en azote- Méthode de kjeldahl. *AFNOR*, 1985; Norme NF-V-04-367. Lait crème et lait concentré non sucré- Determination de la matière sèche – méthode de reference. *AFNOR*, 1989, Norme NF-V-04-208. Lait – Determination des cendres-méthode de référence.
- (13) *FIL-IDF*, Norme Internationale 135A.:1998. Lait et produits laitiers- Caractéristiques de fidélité des méthodes analytiques- schéma de conduite d'une étude collaborative. *FIL-IDF*-Norme Internationale 20B:1993. Lait- Determination De La Teneur En Azote-Partie 4: Détermination de la teneur en azote non protéique. *FIL-IDF*- Norme Internationale 21B: 1987. Lait, crème et lait concentré non sucré-Determination de la matière sèche- Méthode de reference. *FIL-IDF*- Norme Internationale 29: 1964. Lait- Determination de la teneur en caseïne du lait.
- (14) J. Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid; *J Agric Food Chem.*27(6):1256-1262 (1979).
- (15) M.G. Davies, A.J. Thomas. Investigations of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. *J Sci in Food Agric*, 24:1525-1540 (1973).
- (16) J.R. Spies. Determination of tryptofan in proteins. *Analyt Chem.* Arlington. 39(12):1412-1415 (1967).

- (17) F.W. Kotch, R.T. Raines. Self-assembly of synthetic collagen triple helices. *PNAS*. 103(9): 3028-3033 (2006).
- (18) B. Lieske, G. Konrad. Physico-chemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *Int. Dairy Journal*. 6: 13-31 (1996).
- (19) D.J.S. Hulmes, A. Miller, D.A.D. Parry, K.A. Piez, J.W. Galloway. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* 79: 137-148 (1973).
- (20) W. Traub, K.A. Piez. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *Advan. Protein Chem.* 25:243-352 (1971).
- (21) P.M. Gallop, O.O. Blumenfeld, S. Seifter. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *Annu. Rev. Biochem.* 41: 617-672 (1972).
- (22) P.P. Fietzed, P. Wendt, I. Kell, K. Kühn. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *FEBS Letters*. 26: 74-76 (1972).
- (23) M.P. Bell, T.B. Neff, J.W. Polarek, T.W. Seeley. Bovine collagens and gelatins. *Patent Application Publication number US 2004/0018592 A1*, Jan. 29, 2004.
- (24) M.J.C. Crabbe, J.J. Harding. Collagen crosslinking: isolation of two crosslinked peptides involving α -2-CB(3-5) from bovine scleral collagen. *FEBS Letters*. 97(1): 189-192 (1979).

- (25) B. Hee-Guk, K. Se-Kwon. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*. 36:1155–1162 (2001).
- (26) K. Se-Kwon, K. Yong-Tae, B. Hee-Guk, N. Kyung-Soo, J. Dong-Sik, F. Shahidi. Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1984-1989 (2001).

Table I. Basic chemical composition of hydrolyzed bovine and porcine collagens and their fractions obtained through KOCH membranes fractionation.

Samples	Solid Content (%)	Protein Content (%)	Lipid Content (%)	Ash / Mineral (%)	Carbohydrate content (%)
BCH	95.02	93.00	0.05	0.4	1.58
BCH-P1	96.98	96.16	0.03	0.2	0.59
BCH-P2	96.62	95.05	0.03	0.3	1.24
BCH-P3	96.83	95.35	0.03	0.2	1.25
PCH	93.61	90.16	0.05	0.3	3.09
PCH-P1	95.35	95.08	0.03	0.2	0.04
PCH-P2	92.95	92.59	0.03	0.2	0.13
PCH-P3	92.81	91.71	0.03	0.2	0.88

Table II. Amino acid profile of bovine and porcine collagen hydrolysates.

SAMPLES				
AMINO ACIDS				
(g/ 100g)	BCH	BCH-P1	PCH	PCH-P1
aspartic acid	5.80	5.82	5.83	5.77
glutamic acid	10.08	10.30	10.24	10.34
serine	3.26	3.32	3.34	3.35
glycine	23.12	24.71	23.52	24.72
histidine	0.66	0.62	0.67	0.71
arginine	7.52	7.85	8.30	8.70
threonine	1.63	1.80	1.63	1.70
taurine	1.65	1.68	1.63	1.96
alanine	8.90	9.84	8.92	9.51
proline	13.40	14.23	13.60	14.11
tyrosine	0.58	0.54	0.70	0.79
valine	2.87	3.20	2.83	3.15
methionine	1.10	1.20	1.10	1.21
cystine	0.76	0.72	0.53	0.65
isoleucine	1.39	1.54	1.05	1.16
leucine	2.73	3.11	2.59	2.93
phenylalanine	1.71	1.82	1.79	1.99
lysine	2.76	3.03	2.58	3.01
tryptophane	0.12	0.12	0.33	0.06
TOTAL				
AMINO ACID	88.39	93.77	89.55	93.86

Table III. MS data of the peptides of bovine collagen hydrolysate fraction P1 (molecular mass lower than 80KDa).

Peak number	Peptides	Ion fragments (m/z)
1	Fraction one (F1)	429.3, 501.4, 558.5, 579.5, 586.5, 602.5, 611.7, 642.5, 690.8, 736.6, 744.7, 811.5, 832.8, 869.6, 878.7, 922.8, 958.5, 996.7, 1021.8, 1105.8, 1140.8, 1266.5, 1379.9
2	Fraction two (F2)	415.3, 429.3, 459.4, 503.5, 547.6, 564.8, 591.7, 608.5, 635.8, 683.8, 755.5, 810.8, 828.7, 853.9, 879.8, 953.2, 980.9, 999.8, 1035.8, 1103.7, 1148.9, 1157.0, 1259.8
3	Fraction three (F3)	429.3, 449.3, 541.7, 577.7, 585.4, 594.5, 629.5, 635.8, 652.6, 682.7, 696.7, 726.8, 740.8, 757.6, 770.5, 784.9, 814.7, 828.7, 858.8, 902.8, 939.6, 945.5, 979.8, 1090.8, 1147.2, 1217.8, 1290.7, 1395.3, 1455
4	Fraction four (F4)	429.3, 503.1, 541.7, 585.8, 629.5, 673.6, 712.8, 756.5, 800.7, 844.8, 888.8, 932.6, 1149.9

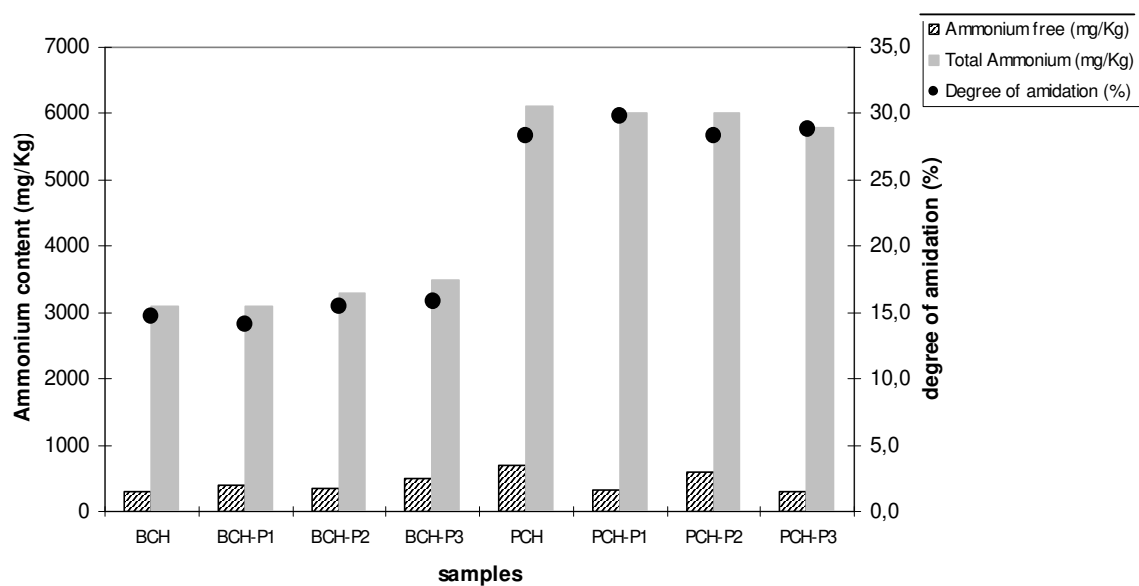


Figure 1. Total, free ammonium content and degree of amidation (%) of bovine and porcine collagen hydrolysates and their fractions obtained through KOCH membranes fractionation.

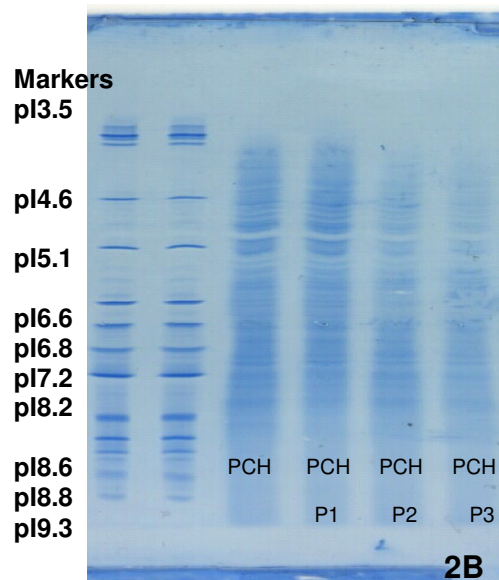
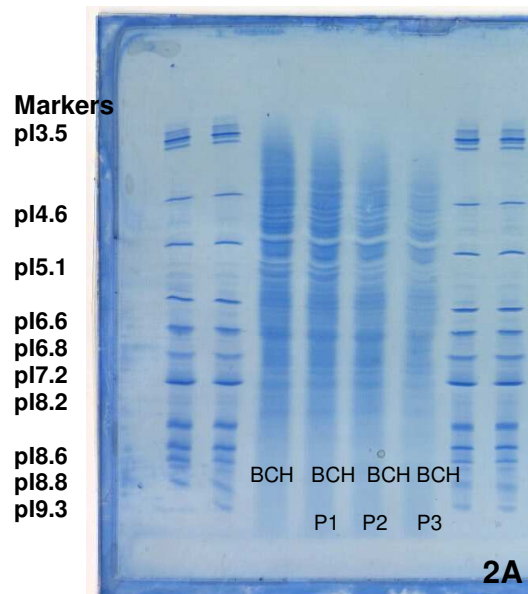


Figure 2 A and B. Isoelectric focusing of bovine (2A) and porcine (2B) collagen hydrolysates and their fractions obtained through KOCH membranes fractionation.

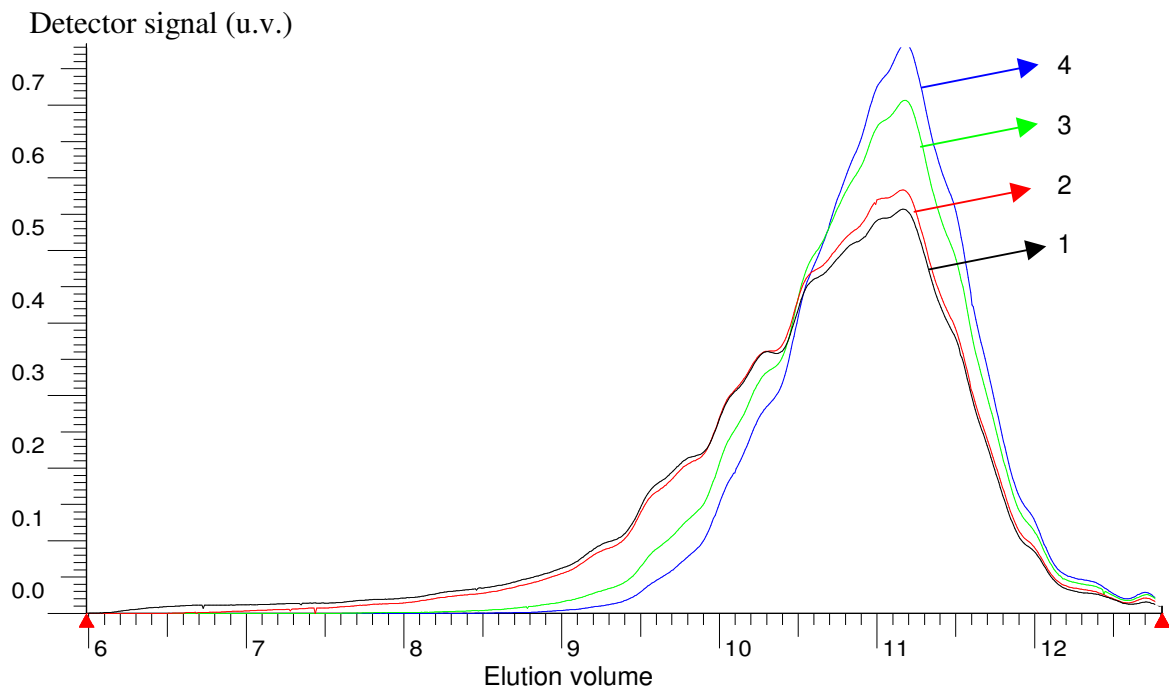


Figure 3A. Gel permeation chromatography of bovine collagen hydrolysates obtained by KOCH membranes fractionation. The lines in the figure 3A are: 1- BCH, mean molecular mass 3.0KDa; 2- BCH-P1, mean molecular mass 2.5KDa; 3- BCH-P2, mean molecular mass 1.7KDa; 4- BCH-P3, mean molecular mass 1.4KDa.

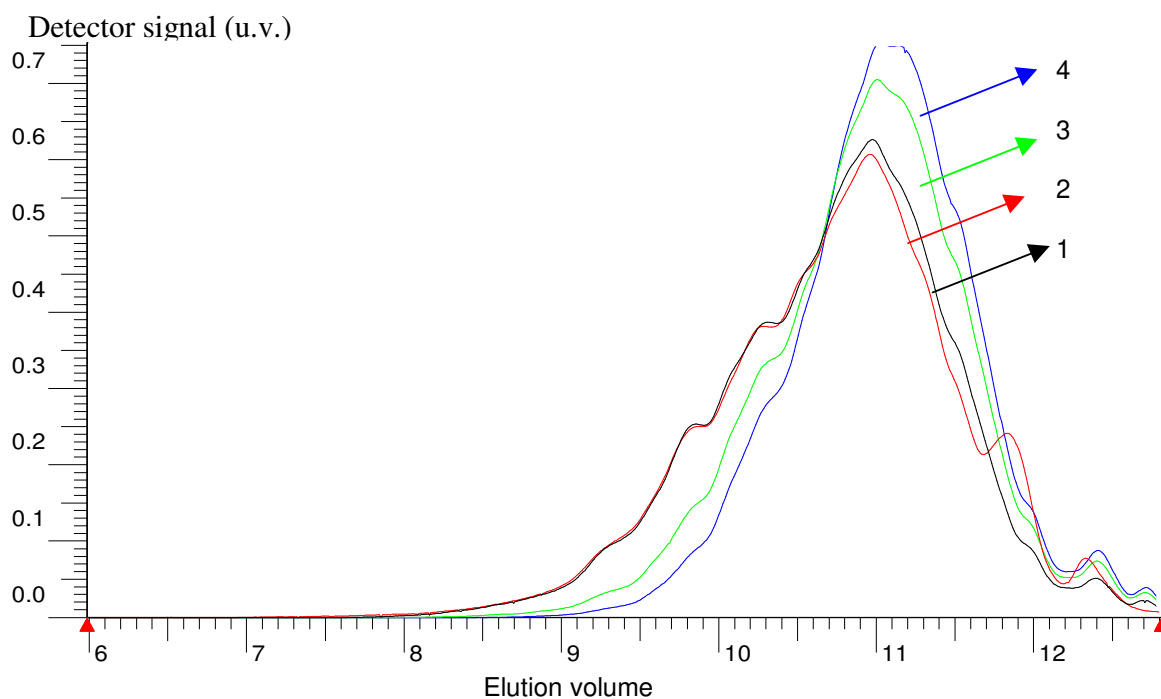


Figure 3B. Gel permeation chromatography of porcine collagen hydrolysates obtained by KOCH membranes fractionation. The lines in the figure 3B are: 1- PCH, mean molecular mass 2.2KDa; 2- PCH-P1, mean molecular mass 2.2KDa; 3- PCH-P2, mean molecular mass 1.6KDa; 4- PCH-P3, mean molecular mass 1.4KDa.

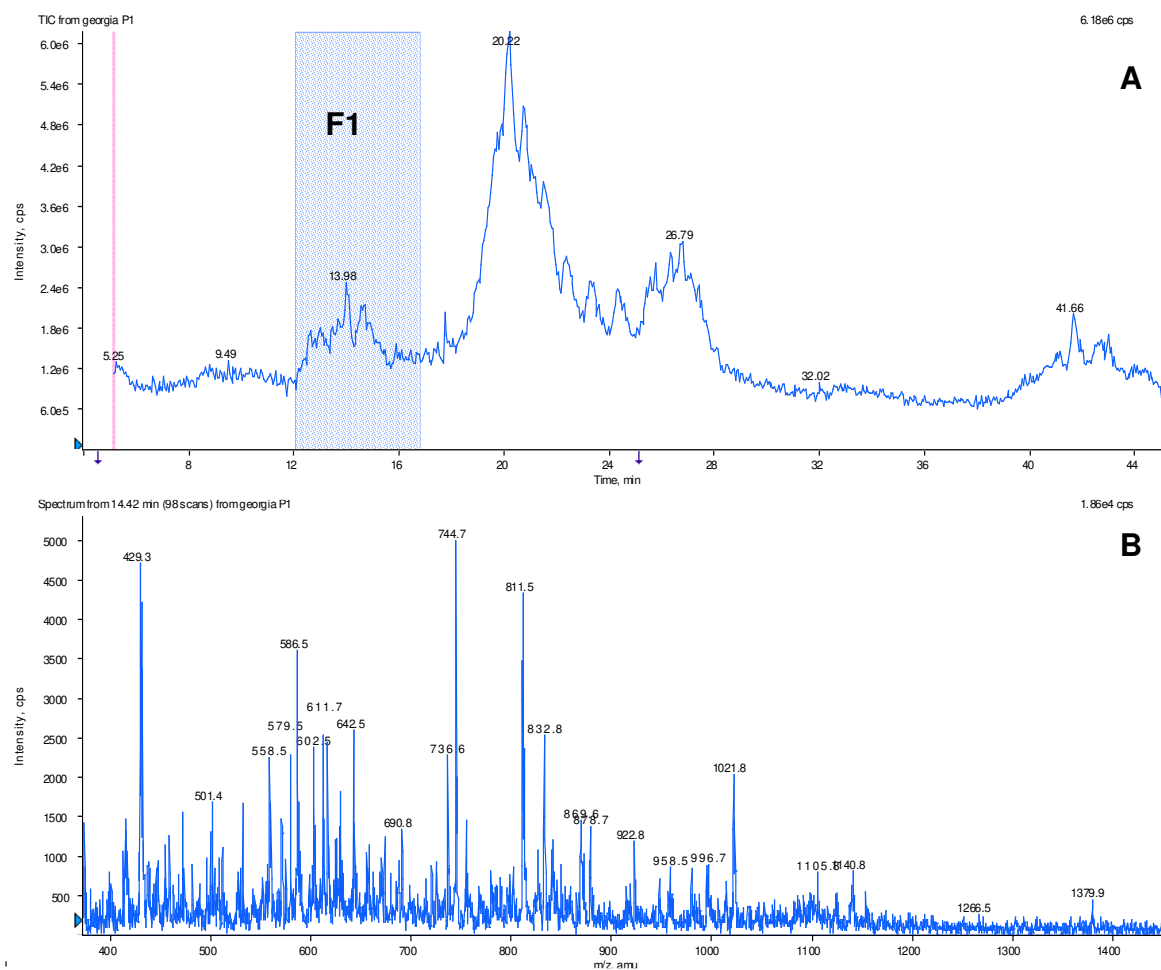


Figure 4A.B. BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction one (F1)

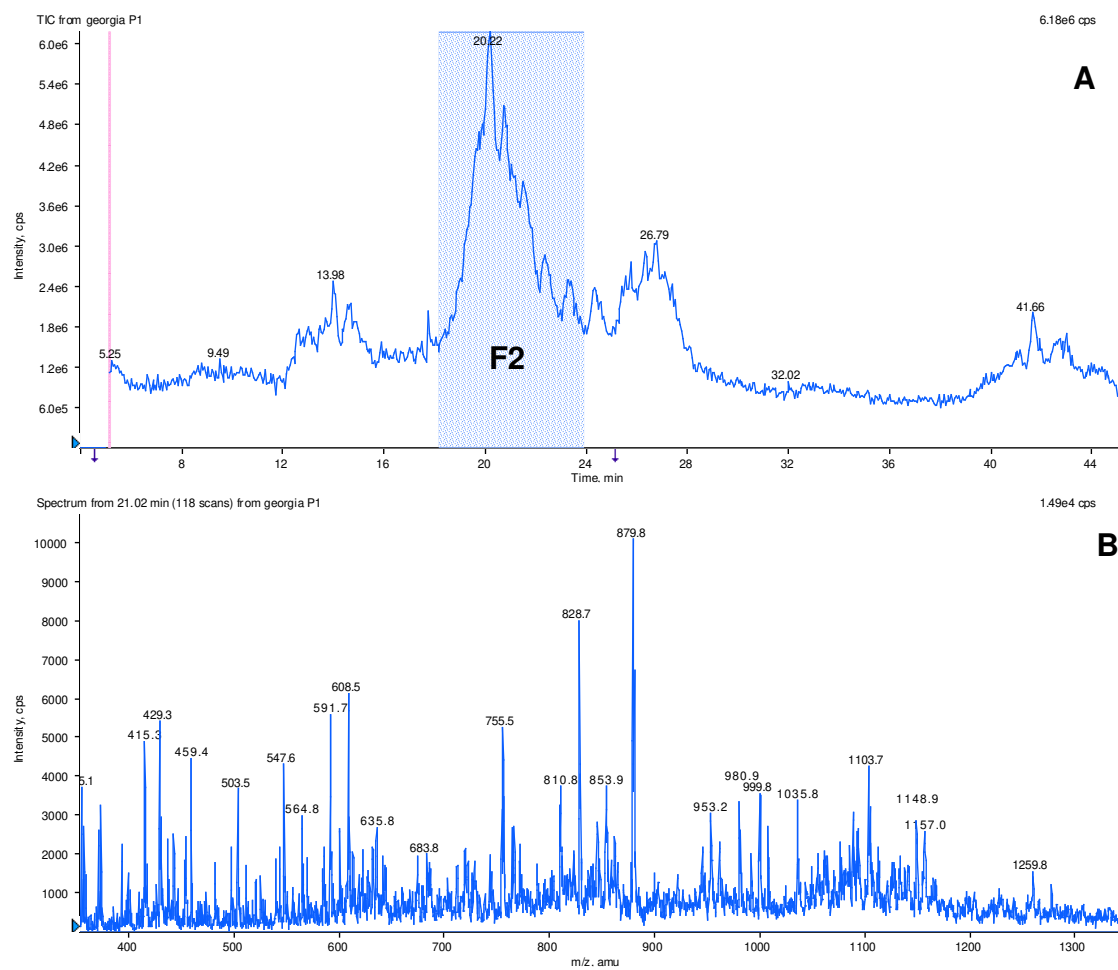


Figure 5A.B. BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction two (F2)

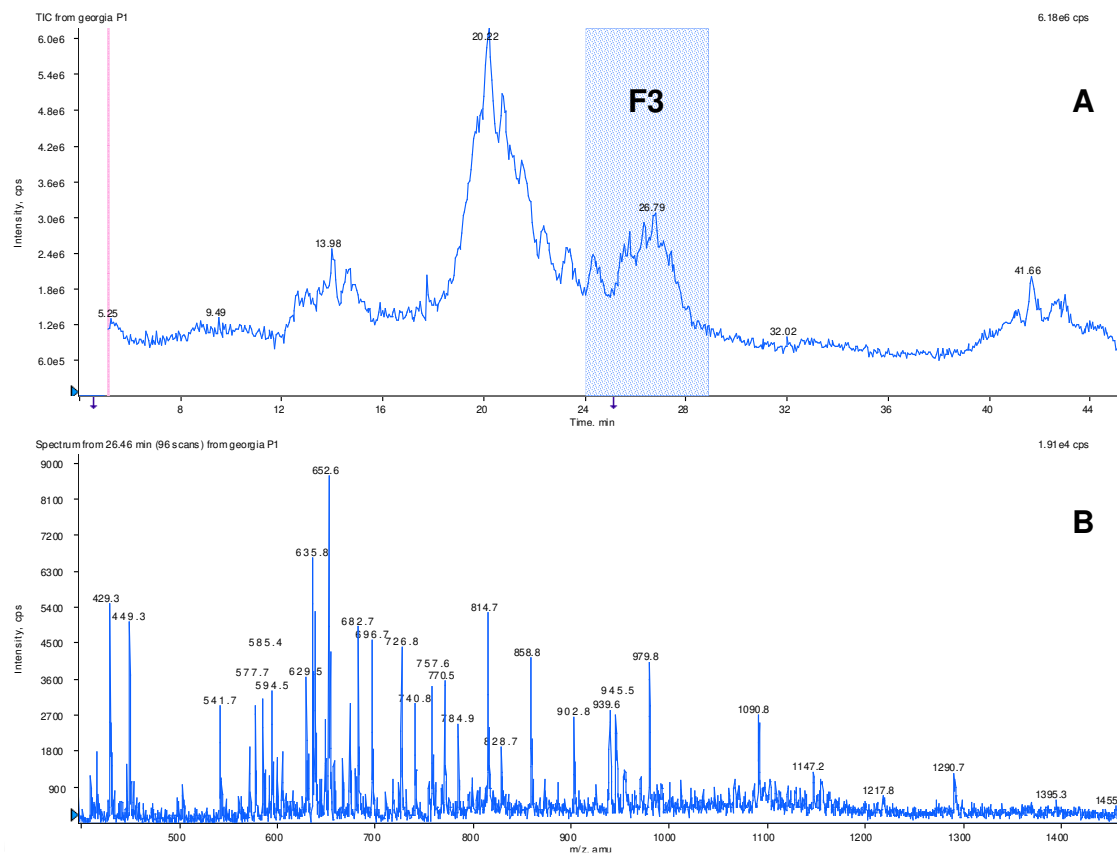


Figure 6A.B. BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction three (F3)

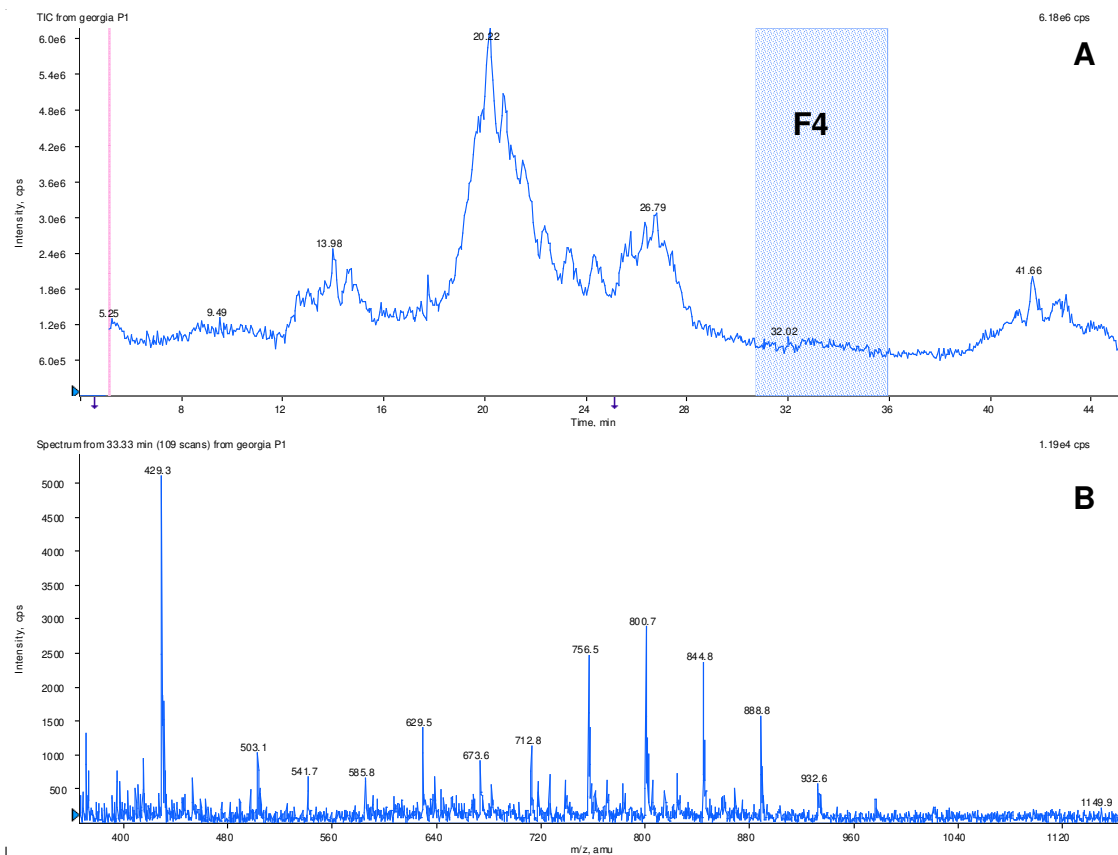


Figure 7A.B. BCH-P1 analyzed by RP-MS generating marked fraction, fraction four (F4)

CAPÍTULO III: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE BOVINO E DE DERIVADOS DE COLÁGENO, SEPARADAMENTE OU EM COMBINAÇÕES, NA INIBIÇÃO DE LESÕES GÁSTRICAS PROVOCADAS PELO ETANOL ABSOLUTO.

ARTIGO 1: “Protective Effect of Collagen Derivates on the Ulcerative Lesions Caused by Oral Administration of Ethanol”.

Publicado no Journal of Medicinal Food, 2007, 10 (1):154-157. (Veja Anexo I).

ARTIGO 2: “Antiulcerogenic Effect of Administration in Rats of a Whey Protein Isolate (WPI) and Collagen Hydrolysates, alone or in combination, against Ethanol Ulcerative Lesions”.

A ser publicado no Nutrition, the International Journal of Applied and Basic Nutrition Science

**Protective Effect of Collagen Derivates on the Ulcerative Lesions Caused by
Oral Administration of Ethanol**

G.A. Castro, ¹ V.C. Sgarbieri, ¹ J.E. Carvalho, ² S.V. Tinti e A. Possenti ²

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos; Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil; Caixa Postal 6121; CEP: 13083-970; E-mail: sgarb@fea.unicamp.br ²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT:

The protective effect of beef (BCH) and pig (PCH) collagen hydrolysates and their fractions were tested as antiulcerogenic agents in rats (250-350 g), against ulcerative lesions caused by ethanol. Beef and pig collagen hydrolysates were fractionated by ultrafiltration into different molecular weight fractions. The protocol employed a negative and a positive control and single dose of the experimental samples given by intragastric intubation. The beef collagen did not present a dose response correlation in the ethanol model whereas pig collagen showed a logarithmic dose response relationship. Beef collagen hydrolysate decreased the ulcerative lesion index (ULI) of 55% versus 61% decrease for pig collagen hydrolysate at the same dosage (750 mg/kg bw). No significant differences were found ($p>0.05$) between the hydrolysate and its fractions.

KEY WORDS: collagen hydrolysates. mucosa protection. ulcerogenic agent. ulcerative lesions.

INTRODUCTION

Collagen has been used for tissue regeneration mainly because of some important properties such as: immunogenicity, ionic capability to attract blood components which are essential to tissue regeneration, platelet aggregation induction in blood coagulation, mechanical protection to digestive tissues cells and slow enzymatic digestibility allowing it to remain in the digestive tract for enough time to promote tissue recovery ¹.

The gastric mucosa is among the most important tissue in the organism on account of its function, structure and pathological processes that can take place in it ². It is accepted that the peptic ulcerogenesis (gastric and duodenal) results from an imbalance between infectious agent such as the bacterium *Helicobacter pylori* or aggressive chemical agents versus protective substances like mucus, bicarbonate, prostaglandins, sulfhydryl compounds as well as the blood flux to the mucosa cells ^{3,4,5,6,7}.

Absolute ethanol acts by destroying mucosal cells by direct contact⁵ independently of the gastric acidity. It destroys initially the stomach protecting layers and finally reaches the superficial mucosa causing cells necrosis and liberation of vasoactive mediators leading to vasoconstriction, edema and hemorrhage ⁸.

In the present research work the possible protective effect of beef and pig collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Collagen hydrolysates

Beef and pig collagen hydrolysates were from commercial production line (lots 40701 and EH 4517, respectively) and supplied by GELITA GROUP (GELITA SOUTH AMERICA) - Cotia, São Paulo, Brazil. The two lots were fractionated by ultrafiltration using a polymeric membrane kit supplied by WGM, São Paulo, Brazil, presenting different molecular weight cut off: a) KOCH membrane N°. 180 (4439-5 S4-M) molecular weight cut off 50KD-80KD; b) KOCH membrane N°.131 (KM824936 3022N) molecular weight cut off 5KD-8KD; c) KOCH membrane N°. 328 (KM830532-3003V) molecular weight cut off 1KD-2KD.

Solution of 25% (w/v) of beef or pig collagen hydrolysate was prepared and passed through the first membrane (a). The permeate from this membrane (P1) was passed through the second membrane (b) collecting a second permeate (P2) and finally the permeate P2 was passed through the third membrane (c) generating a permeate (P3). To the permeates were added 600ppm hydrogen peroxide to preserve it until dehydration by spray drying. The solutions were kept under refrigeration to be spray dried in the next day at a feeding temperature of approximately 130°C and an outlet temperature of 50°C.

Experimental ulcerogenesis protocol

The general protocol adopted in this investigation is illustrated in Figure 1. The rats (*Rattus norvegicus*) used were adult males of the Wistar strain weighing

250 – 350 g, acquired from the experimental animal colony of the University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. Prior to the experiments, the animals were maintained for at least 7 days at the experimental laboratory at 20°C with alternating cycles of 12h light and 12h dark, receiving commercial ration and water *ad libitum*.

The protocol used physiological saline (10mL/ Kg bw) as negative control, carbenoxolone (200 mg/Kg bw) an antiulcerogenic drug as positive control, and absolute ethanol (1 mL/ animal) as the ulcerogenic agent. The experimental samples (beef or pig collagen hydrolysate) were administered in single doses and in different amounts. The saline, the carbenoxolone, the ethanol and the experimental samples were all given to the rat by intragastric intubation.

The protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Ulcerative lesion analysis

The ulcerative lesion index (ULI) was estimated by the summation of parameters, as follows⁹: loss of normal mucosa morphology, 1 point; discoloration, 1 point; mucosa edema, 1 point; hemorrhage, 1 point; petechial points (until 9), 2 points; petechial points (>10), 3 points; ulcers (up to 1mm), $n^* \times 2$ points; ulcers (>1mm), $n^* \times 3$ points; perforated ulcers, $n^* \times 4$ points; (n^* = number of ulcers found). Percent reduction of the ULI was calculated by the expression: % reduction ULI = {(mean ULI negative control – mean ULI testing sample) / mean ULI negative

control)) x 100. The number of rats used in each test for the calculation of the ULI varied from six to thirty, depending on variation encountered in the experiments.

The effective dose for 50% decrease of ULI (ED₅₀) was calculated by using increasing single doses (100, 200, 375, 750, 1000, 1500 mg/Kg bw) of the testing sample and a logarithmic correlation equation.

Statistical analysis

The experimental results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the criterion for critical statistical significance was 5% probability ($p < 0.05$). Comparison of means was done by Duncan's test.

RESULTS

Table 1 shows the reduction in the ULI due to intragastric intubation of increasing single doses of beef collagen hydrolysate. A reduction of the order of 20% in the ULI was observed for the dosage of 100 mg/Kg bw whereas a reduction of about 55% in the ULI from dosages ranging from 200 to 1,500 mg beef collagen hydrolysate per Kg of rat body weight were measured, with no statistical differences among these dosages. Therefore, beef collagen hydrolysate reached a maximum of 55% reduction in ULI at a dosage 200 mg/Kg bw with no reduction correlation in the range of 200 to 1,500 mg dosages per Kg body weight.

The antiulcerogenic drug carbenoxolone reduced ULI by 86%. All the results are based on the physiological saline as negative control.

TABLE 1. THE ULI (ULCERATIVE LESIONS INDEX) OBTAINED FOR CARBENOXOLONE AND BEEF COLLAGEN HYDROLYSATE (BCH) AT DIFFERENT CONCENTRATIONS, USING ETHANOL MODEL AND SINGLE DOSE GASTRIC INTUBATION.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	%Reduction of ULI
Saline (a)	-	31	122.1 $\pm$ 28.1	
Carbenoxolone	200	30	17.4 $\pm$ 8.4***	85.8
BCH	50	6	122.7 $\pm$ 26.6 ^{ns}	0
BCH	100	22	98.7 $\pm$ 29.9**	19.1
BCH	200	15	57.7 $\pm$ 21.1***	52.7
BCH	375	12	59.7 $\pm$ 17.8***	51.1
BCH	750	19	54.4 $\pm$ 19.8***	55.4
BCH	1000	12	62.7 $\pm$ 11.3***	48.6
BCH	1500	10	55.5 $\pm$ 11.8***	54.5

(a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw. ANOVA $F_{(8,155)} = 56.71$, $P < 0.00001$ by Duncan`s test. ns= non significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The efficacy of pig collagen hydrolysate to decrease the ULI is reported in Table 2. Contrary to the beef collagen, pig collagen presented a logarithmic dose response relationship in the range of single doses from 100 to 1,500 mg pig collagen hydrolysate per Kg of rat body weight. The reduction in ULI ranged from 12% (100mg) to 75% (1,500 mg/ Kg bw).

TABLE 2. DOSAGE EFFECT FOR PIG COLLAGEN HYDROLYSATE (PCH) USING ETHANOL MODEL AND SINGLE DOSE GASTRIC INTUBATION.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	% Reduction of ULI
Saline (a)	-	36	122.1 $\pm$ 28.12	
Carbenoxolone	200	36	17.6 $\pm$ 8.4***	85.5
PCH	100	6	107.4 $\pm$ 19.2 ^{ns}	11.9
PCH	200	15	85.7 $\pm$ 24.9**	29.8
PCH	375	20	70.5 $\pm$ 24.5**	42.2
PCH	750	15	47.9 $\pm$ 19.4***	60.7
PCH	1000	16	53.2 $\pm$ 20.4***	56.4
PCH	1500	6	30.4 $\pm$ 5.3 ***	75.1

(a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw. ANOVA $F_{(7,149)} = 68.60$, $P < 0.00001$ by Duncan`s test. ns= non significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The logarithmic equation and the curve showing this relationship is shown in Figure 2. This equation permitted a calculation of an ED₅₀ of 541 mg of pig collagen per Kg of rat body weight.

Compared with the saline treatment, carbenoxolone (positive control) reduced the ULI by 85.5% ($p < 0.001$) while the pig collagen reduced it by 60.7% and for beef collagen the reduction was about 55% at a dosage of 750 mg/ Kg bw.

The comparative effect of a single dose of 200 mg/ Kg bw of beef collagen hydrolysate and its hydrolysate fractions (P1, P2 and P3) in the reduction of the ULI is shown in Table 3. Based on the physiological saline the beef hydrolysate did not differ from the fraction beef P3 ($p>0.01$) but both differed from beef P1 and P2, which differed from saline at only $p< 0.05$. Carbenoxolone (antiulcerative drug) also referred to saline differed from all the collagen samples ($p<0.001$) with a reduction in the ULI of 83.7%.

TABLE 3. DOSAGE EFFECT FOR BEEF COLLAGEN HYDROLYSATE (BCH) AND ITS FRACTIONS P1, P2 AND P3 USING ETHANOL MODEL AND SINGLE DOSE GASTRIC INTUBATION.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	% Reduction of ULI
Saline (a)	-	17	124.3 $\pm$ 40.24	
Carbenoxolone	200	18	20.28 $\pm$ 4.39***	83.7
BCH	200	23	73.96 $\pm$ 34.06**	40.5
BCH-P1	200	6	87.33 $\pm$ 22.29*	29.7
BCH-P2	200	6	94.00 $\pm$ 32.80*	24.4
BCH-P3	200	6	79.50 $\pm$ 21.81*	36.0

(a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw. ANOVA $F_{(5,75)} = 22.22$, $P<0.00001$ by Duncan`s test. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Table 4, comparatively shows the difference in ULI reduction between carbenoxolone and the pig collagen hydrolysate samples. Carbenoxolone

reduction of 83.7% was statistically different from the collagen samples which reduced the ULI in the range of 47 to 53% with no statistical differences among themselves ($p>0.01$).

TABLE 4. DOSAGE EFFECT FOR PIG COLLAGEN HYDROLYSATE (PCH) AND ITS FRACTIONS P1, P2 AND P3 USING ETHANOL MODEL AND SINGLE DOSE GASTRIC INTUBATION.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	% Reduction of ULI
Saline (a)	-	17	124.3 $\pm$ 40.24	
Carbenoxolone	200	18	20.28 $\pm$ 4.39 ***	83.7
PCH	750	21	57.90 $\pm$ 23.00 ***	53.4
PCH-P1	750	6	60.50 $\pm$ 18.85 ***	51.3
PCH-P2	750	12	66.33 $\pm$ 26.49 ***	46.6
PCH-P3	750	6	62.50 $\pm$ 14.47 ***	49.7

(a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw. ANOVA $F_{(5,79)} = 30.32$, $P<0.00001$ by Duncan`s test. *** $p<0.001$.

DISCUSSION

Ethanol is an ulcerogenic agent which acts on the stomach mucosa promoting lesions, causing stomach acid secretion, decreased prostaglandin production, increased acetylcholine and increased intracellular calcium. These are

all factors which increase gastric secretion in various kinds of stress¹⁰ . Inflammatory response may take place as a consequence of the gastric mucosa ulcerogenesis involving cellular proliferation , cellular motility, chemotactic events, adherence phenomenon, vasodilation, increased blood flow and alterations in metabolic, secretory and cellular receptor functions ^{11,12}.

Leucocytes passing through the endothelium reach the tissues and interact with proteins present in the extracellular matrix, as the collagen. The leucocytes migration involves adhesion of cells as integrins, using proteins as collagen, laminin and fibronectin as ligands ^{11,12}. The function of collagen is to offer mechanical resistance to the tissues which could be measured through immature and mature collagen present in the mucosa or tissue lesions.

Some investigators ^{13,14,15,16} have demonstrated that collagen and collagen hydrolysate can stimulate cell proliferation such as chondrocytes and adipocytes and extracellular matrix proteins. Type I bovine tendon collagen was used to recover duodenal mucosal lesion produced by *Phaseolus vulgaris* lectin ¹.

The results of the present work permit to conclude that both pig and beef collagen hydrolysates, and their fractions of different molecular mass ranges, protect the rat stomach mucosa against ulcerative lesions caused by ethanol, reducing the ulcerative lesions index (ULI) up to 75% by a single dose intragastric administration.

To the author's knowledge this is the first work demonstrating the antiulcerogenic effect of either bovine (beef) or porcine (pig) collagen hydrolysates.

Some possible mechanisms through which collagen hydrolysates can protect the stomach mucosa from ethanol lesions will be reported in the next article in this thesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support given by Gelita South America, Cotia, SP, and by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and the CPQBA (State University of Campinas) the technical support.

REFERENCES

1. Santos CDI: Ação do colágeno extraído de tendões bovinos (colágeno tipo I) na recuperação de lesões da mucosa duodenal induzidas por lectinas de feijão (Phaseolus Vulgaris). *Dissertação de mestrado* do Departamento de Ciência da Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1992.
2. Melo JRC, Castro JP, Lanna JCBD, Guimarães JT, Sobrinho JMDL: Anatomia do estômago e anatomia do desenvolvimento. In: Dani R and Castro LP (Eds). *Gastroenterologia Clinica* 1993, vol. 1, pp 449-459, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil.
3. Kontareck SJ: Mechanisms of gastric protection. *Scan J Gastroenterol* 1993; 174 (Suppl): 15-28.
4. Abdel-Salam DME, Czimmer J, Debreuni A, Szolesanyi J, Mozsik G: Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol* 2001; 95: 105-127.
5. Robert A: Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterol* 1979; 77: 761-767.
6. Allen A, Flemström G, Garner A, Kivilaasko E: Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev* 1993; 73:823-857.

7. Szabo S, Nagy L, Pevebam M: Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteinases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta* 1992; 206: 95-105.
8. Oates PJ, Hakkinen JP: Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterol* 1988; 94: 10-21.
9. Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ: Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* .1991; 86:137-139.
10. Das D, Banerjee RK: Effects of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cell Biochem* 1993; 125: 115-125.
11. Pimentel E R: Matriz extracelular. In: *A Célula 2001*. 1^a ed., Manole, São Paulo, 2001, pp. 217-234.
12. Roitt I, Brostoff J, Male D: *Imunologia*, 5^a ed., Manole, São Paulo, 1999, pp. 61-69.
13. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J: Oral administration of ¹⁴C labelled gelatin hydrolysate leads to na accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr* 1999; 129: 1891-1895.

14. Oesser S, Seifert J: Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 2003; 311: 393-399.
15. Nakajima I, Muroya S, Tanabe R-i, Chikumi K: Positive effect of collagen V and VI on triglyceride accumulation during differentiation in culture of bovine intramuscular adipocytes. *Differentiation* 2002; 70: 84-91.
16. Nakajima I, Muroya S, Tanabe R-i, Chikumi K: Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen. *Biol of the cell* 2002; 94: 197-203.

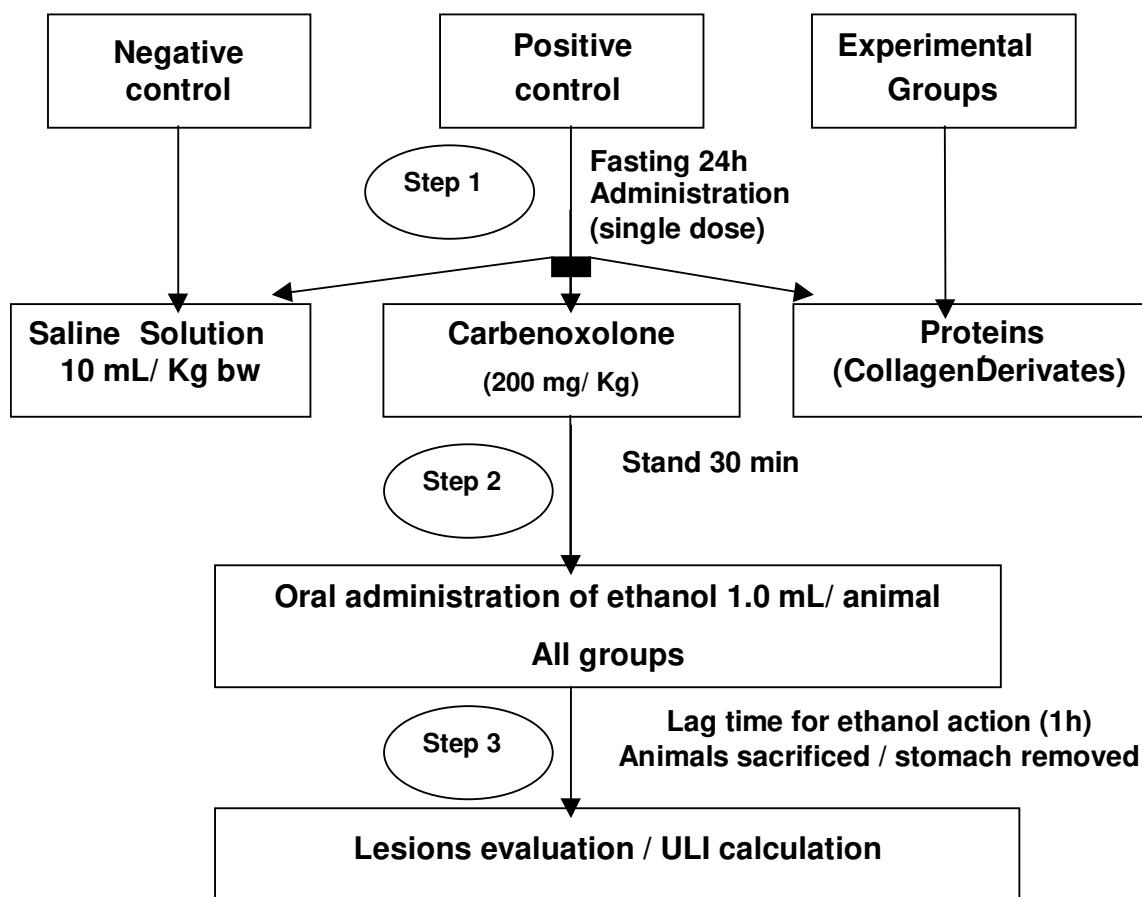


Figure 1. Experimental ulcerogenesis protocol.

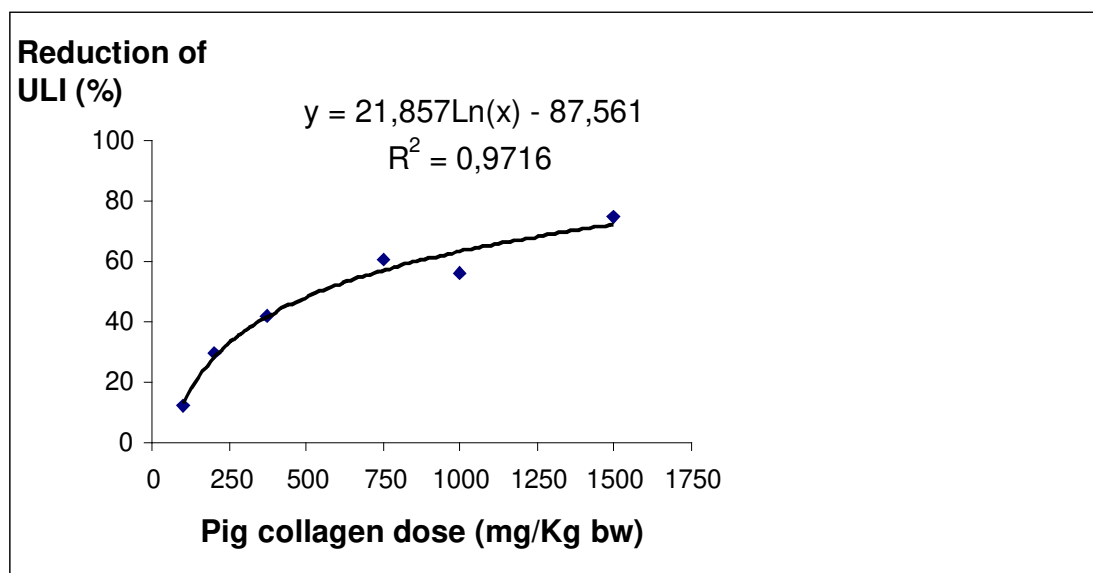


Figure 2. Logarithmic regression curve and equation of dose-effect of pig collagen on reduction of the ULI for the ethanol model of stomach ulcer induction in rats.

The equation, x = mg of tested sample, y = % reduction ULI.

Antiulcerogenic Effect of Administration in Rats of a Whey Protein Isolate and Collagen Hydrolysates, Against Ethanol Ulcerative Lesions.

Geórgia A. Castro, PhD¹ João E. Carvalho, PhD² Sirlene V. Tinti, tech.² Ana Possenti, biologist² Elisangela Farias, PhD¹ Valdemiro C. Sgarbieri, PhD¹

¹Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos; Universidade Estadual de Campinas, ²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Word counting: 5556 words.

Number of figures: one

Number of tables: six

Running title: Antiulcerogenic Effect of WPI and Hydrolyzed Collagen

1 To whom correspondence should be addressed. Depto. de Alimentos e Nutrição, Rua Monteiro Lobato, 80. Faculdade de Engenharia de Alimentos (Unicamp) – CEP 13083-970. Campinas, SP, Brasil; TELEPHONE: 55 19 3521 4059; e-mail:

sgarb@fea.unicamp.br

ABSTRACT. Whey protein isolate (WPI) and both bovine and porcine collagen hydrolysates, administered by gavages protected rat stomach mucosa from ulcerative lesions caused by ethanol, reducing the ulcerative lesion index (ULI) in a range of 40 to 77% depending on the dosage. In acute experiments (single dose) physiological saline (10mL/Kg body weight) was used as the negative control and carbenoxolone (200mg/Kg bw) was used as positive control. Mixtures of WPI with either porcine (PCH) or bovine (BCH) collagen hydrolysates gave results that suggested synergisms between WPI and the collagen hydrolysates. One of the most interesting mixtures was WPI/ BCH at the proportion of 375:375 mg/Kg bw, which decreased ULI of 64%. The mechanism for mucosal protection involved a decrease in plasma gastrin (~40%), a significant increase (50 to 267%) in mucus production, and a reduction in ULI (%) when intragastric intubations were conducted after *in vivo* alkylation by N-ethylmaleimide (NEM). The results suggested that gastrin, sulfhydryl substances and some mechanisms on mucus production are all involved in gastric ulcer protection against ethanol. The collagen hydrolysates, both porcine and bovine, presented stronger effect in mucus production, on the other hand, WPI effect was also dependent of sulfhydryl compounds, resulting in more protective effect when the two proteins were administrated together.

KEY WORDS: • mechanism • mucosa protection • ulcerative lesion • collagen
• whey protein

INTRODUCTION

The gastric mucosa is among the most important tissues in the organism on account of its function, structure and pathological processes that can take place in it [1]. It is accepted that the peptic ulcerogenesis (gastric and duodenal) results from an imbalance between infectious agent like the bacterium *Helicobacter pylori* or aggressive chemical agents and stresses versus protective substances such as proteins, glutathione, other sulfhydryl groups containing substances, mucus, bicarbonate, prostaglandins (PGE₂, PGI₂), certain types of dietary fibers as well as the blood flux to the mucosa cells [2,3,4,5,6,7].

Absolute ethanol is an ulcerogenic agent acting by destroying mucosal cells by direct contact [5] independently of the gastric acidity. It initially destroys the stomach protecting layers and finally reaches the mucosa cells surface causing cells necrosis and liberation of vasoactive mediators leading to vasoconstriction, edema and hemorrhage [5].

Rosaneli et al. [8,9] demonstrated in rat antiulcerative property, of a whey protein concentrate produced in pilot plant [10] against two ulcerogenic agents, ethanol and indomethacin.

Recently [11,12,13], it has been shown that one of the most antiulcerogenic protein in bovine milk whey protein is the α -lactalbumin, whereas β -lactoglobulin did not show antiulcerogenic effect [13].

Collagen hydrolysates have been described as efficiently absorbed [14] and stimulating cells regeneration, extracellular matrix production as well as cytokines modulation [15,16,17].

Santos [18] described the action of collagen extracted from bovine tendons (type I collagen) on the recovery of duodenal mucosa lesions caused by *Phaseolus vulgaris* lectins.

Recently published work [19] reported that both bovine and porcine collagen hydrolysates were effective in protecting gastric mucosa ethanol lesions inhibiting 55 to 60% of the ulcerative lesion index (ULI) by single dose (750mg/Kg bw) hydrolysate prior to intragastric administration of 1mL/rat of absolute ethanol.

The main objectives of the present investigation were: a) comparatively studying the antiulcerogenic efficacy of two commercial collagen hydrolysates (CH) and a WPI on the inhibition of gastric mucosa lesions induced by intragastric intubation of absolute ethanol, in rat; b) look for possible synergistic action of various combinations of WPI and CH on gastric mucosa protection against ethanol lesions; c) trying to understand some of the possible ways WPI and CH might protect the gastric mucosa from ethanol lesions.

MATERIALS AND METHODS

Collagen hydrolysates

Bovine and porcine collagen hydrolysates (BCH and PCH) were from commercial production line (lots EH4517 and PL- 040701) respectively, and were

supplied by Gelita (Gelita South America) – Cotia, SP, Brazil in a form of spray dried powder. The gross percentual composition for both hydrolysates was 91% protein, 0.39% minerals, 0.09% fat and 1.51% carbohydrate.

Production of WPI

Whey protein isolate (WPI) was produced in pilot plant from defatted and microfiltered (1-1.4 μ m membrane) by the use of a ceramic membrane (0.1-0.14 μ m Alumine Zircone) to separate casein micelles from milk whey. The milk whey was then concentrated by ultrafiltration (8KDa cut off membrane), dehydrated and freeze-dried [20].

Experimental ulcerogenesis

The experimental model used male *Wistar* rats (250-350 g body weight) from the experimental colony of the State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. The number of animals used in each test will be specified in the results section.

The model used absolute ethanol (1mL/rat) as the ulcerogenic agent, physiological saline (10 mL/Kg bw) as negative control, and carbenoxolone (200mg/Kg bw) as positive control. The experimental samples were given by intragastric intubation at different quantities dissolved in saline. Carbenoxolone was also dissolved in saline and administered by gastric intubation.

Two types of experiments were performed: a single-dose (acute) or a double-dose (repetitive) experiment in two consecutive days. A fluxogram illustrating the general protocol for both single-dose and double-dose experiments is shown in

Figure 1. Single-dose (acute) experiments were performed by omitting step 2 of Figure 1. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the State University of Campinas, SP, Brazil.

Insert Figure 1

Ulcerative lesions analysis

The quantification of ulcerative lesions was done by calculation of an ulcerative lesion index (ULI) using the sum of the following parameters [21]: loss of normal mucosa morphology, 1 point; mucosa discoloration, 1 point; mucosa edema, 1 point; hemorrhage, 1 point; petechial points (until 9), 2 points; petechial points (>10), 3 points; ulcers (up to 1 mm), $n^* \times 2$ points; ulcers (>1 mm), $n^* \times 3$ points; perforated ulcers, $n^* \times 4$ points; (n^* = number of ulcers found).

Percent reduction of the ULI was calculated by the expression: % reduction ULI = { (mean ULI negative control – mean ULI testing sample) / mean ULI negative control)} x 100.

The effective dose for 50% reduction of the ULI (ED_{50}) was calculated by using increasing single doses (200, 250, 750, 1000, 1500) mg sample per Kg rat body weight. The dose response relationship was fitted into a logarithmic equation which permitted the calculation of the ED_{50} for collagen hydrolysate and WPI.

Gastrin determination

According to proposed protocol Figure 1 (omitting step 2), one hour after ethanol administration, blood was collected from ocular plexus, treated with EDTA and centrifuged (3,000g, 15 min, 4°C) and the plasma was stored (-20°C) until gastrin determination. Gastrin was determined in the rat blood plasma [22] using the radioimmune assay kit supplied by CIS Bio International. Residual radioactivity bound to the tubes was measured in a gamma scintillation counter for 1 minute.

Determination of mucus linked to the gastric mucosa

One hour after administration of ethanol (Fig. 1) the mucus glandular region of the stomach mucosa was removed and immersed into 10mL of 0.1% alcian blue solution for 2 h, then washed (2x) with 10 mL 0.25M sucrose solution for 15 min and 45 min, respectively. The dye complexed with the gastric mucus was extracted (2 h) with 10 mL 0.5M MgCl₂ solution. The extracted material was emulsified with 10mL ethyl ether and then centrifuged (1,300g, 15 min, 4°C). The ether phase was discarded and the absorption of the aqueous phase was read in a spectrophotometer at 598 nm [23]. Linked alcian blue was quantified (g dye/ g original tissue) based in a dye standard curve.

Sulfhydryl substances and the gastric mucosa protection

Rats weighing 250-350 g were submitted to treatments by gastric intubation, according to the protocol of Figure 1. In this series of tests two controls were used: a) physiological saline at 10mL/ Kg bw or b) saline (10 mL/ Kg bw) plus 10 mg/Kg

bw of N-ethylmaleimide (NEM). In both controls, saline (a) was given by gastric intubation whereas NEM (b) was administered by subcutaneous injection.

Half of the remaining groups (experimental) received only the testing samples whereas the other half received the testing samples plus NEM, as illustrated in Table 6. The remaining of the procedures were identical with the protocol of Figure 1.

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM. The experimental results were subjected to analysis of variance (ANOVA), and the criteria for critical statistical significance was 5% probability ($p < 0.05$). Comparisons of means were done by Tukey's or Dunnet's tests.

The dose-response relationship was established by adjustment of the experimental points to a logarithmic correlation equation. The equations for porcine collagen ($y = 21.857 \ln x - 87.561$, $R^2 = 0.9716$) and for WPI ($y = 21.652 \ln x - 78.969$, $R^2 = 0.9776$) were established where $y =$ % reduction ULI and $x =$ mg of tested sample.

RESULTS

The mathematic model established for porcine collagen and WPI permitted to calculate a logarithmic equations to obtain an ED₅₀ of 541mg/Kg bw for porcine collagen and an ED₅₀ of 386mg/Kg bw for WPI, in single dose experiments. The bovine collagen hydrolysate did not show a dose-response relationship; therefore the ED₅₀ for bovine collagen could not be determined. Porcine collagen and WPI administered at the maximum dosage of 1,500 mg/Kg bw presented a reduced ULI of 76% and of 80%, respectively referred to saline, as negative control, taken as 100%.

Variable quantities of WPI with bovine collagen hydrolysate (BCH) were combined and ULI was reduced for single dose (acute) experiments is shown in Table 1.

Various combinations of BCH/ WPI promoted a percent reduction of ULI in the range of 22% for the dosage 200/175 mg/Kg bw to 64% for the dosage of 375/ 375 mg/Kg bw. No statistical differences were found ($p>0.05$) among the various combinations tested except for the combination 200/175 mg/Kg bw statistically different ($p<0.05$) compared to all other combinations. Combinations BCH/ WPI (187/ 187) and BCH/ WPI (200/ 550) mg/Kg bw differed from carbenoxolone and from all other combinations ($p<0.01$).

Insert Table 1

Table 2 shows the effect of various combinations, single dose prior to administration of 1mL/ rat of absolute ethanol, of porcine collagen hydrolysate (PCH) and whey protein isolate (WPI) on the percent reduction of ULI for the rat stomach mucosa. The reduction of the ULI ranged from 31% to 57% with no

statistical differences among the various combinations, except for the combination PCH/ WPI of 187/187 with a lower ($p<0.01$) percent reduction with regard to saline. The combination of PCH/ WPI in the dosage of 375/ 375 mg/Kg bw seem to be of interest, considering the relative cost and availability of the collagen hydrolysate and of the WPI, and the efficacy of 56% reduction in the ULI. It also suggests a certain synergism of PCH and WPI at this dosage since other combinations at the same total dosage of 750 mg/Kg bw showed relatively lower percent reduction in the ULI. Increasing PCH and decreasing WPI a decreasing tendency in the ULI reduction was observed.

Insert Table 2

The results of a double dose experiment comparing the efficacy of BCH and PCH alone or in combinations with WPI are shown in Table 3. Some interesting comparisons are as follows: double dose of 1,500 mg/ Kg bw of BCH showed same efficacy as 750 mg/Kg bw of WPI and as the combination of BCH/ WPI of 375/375 mg/Kg bw, emphasizing higher efficacy of WPI in comparison with the BCH and once more suggesting a synergistic effect of the combination BCH/ WPI at the dosage of 375/375 mg/Kg bw. On the other hand, the combination BCH/ WPI seemed to perform better than PCH/ WPI in reducing the ULI caused by ethanol in the rat stomach mucosa.

Insert Table 3

Table 4 presents the results of gastrin analysis in the rats blood plasma intubated with controls (saline or carbenoxolone), WPI, PCH, BCH and combinations of WPI with either PCH or BCH. Percentage decrease of plasma

gastrin was of the order of 40% for carbenoxolone, WPI and BCH with no statistical differences among them. Carbenoxolone and BCH hydrolysate, both at 200 mg/Kg bw, were equally efficient in decreasing plasma gastrin.

The combination PCH/WPI, 150/600 mg/Kg bw was the most efficient treatment (47% reduction in gastrin) and differed from all the other treatments ($p<0.001$). All the calculations were referred to the saline (negative control).

Insert Table 4

The gastric mucus stimulating power of carbenoxolone, WPI, porcine and bovine collagen hydrolysates and combination of either PCH or BCH with WPI is presented in Table 5.

Carbenoxolone at the dosage of 200 mg/ Kg bw increased mucus in the gastric mucosa of 198% compared with 58.9% increase for BCH, at the same dosage. On the other hand at 750mg/Kg bw, WPI increased mucus concentration of 168.5% compared with an increase of 158.5% for PCH, at the same dosage. Comparing two combinations of WPI with either PCH or BCH, PCH /WPI (150:600 mg/Kg bw) increased mucus in the mucosa of 267% while for BCH/WPI (375:375 mg/ Kg bw) the increase was only 51.5%. All calculations were done considering saline as the control. The comparisons between the various dosages and agents suggest the following: carbenoxolone is a strong mucus stimulating drug, as was already expected. Among the samples under study, WPI and PCH seemed to be equally stimulating at the same dosage of 750 mg/Kg bw, on the other hand BCH/WPI (375:375 mg/ Kg bw) did not differ from 200 mg/ Kg bw BCH alone suggesting that the 375:375 mg/kg bw of BCH/WPI exerts a negative synergism for

mucus production while the PCH/WPI (150:600 mg/Kg bw) was highly stimulating, suggesting a positive synergism among the two components.

Insert Table 5

The relative importance of free sulfhydryl groups containing substances on protecting the gastric mucosa against absolute ethanol ulcerative lesions was demonstrated by *in vivo* alkylation of SH groups with N-ethylmaleimide (NEM). Table 6 illustrates the percentage decrease of ULI in the rat stomach mucosa by the various samples studied, in the absence (a) or in the presence (b) of the alkylating agent.

By eliminating the protecting effect of the sulfhydryl groups by NEM alkylation, the percent decrease in the ULI dropped significantly. It is of interest to notice that the effect of combinations of WPI with collagen hydrolysates were less sensitive to alkylation, suggesting a lower dependence of sulfhydryl compounds protection.

Insert Table 6

DISCUSSION

Ethanol is an ulcerogenic agent which acts directly on the mucosa as an aggressive substance promoting lesions and is also capable of stimulating stomach acid secretion, increasing in gastric mobility, decrease in blood flux in the mucosa, decrease prostaglandin production, increase acetyl choline and intracellular calcium. Some of these factors are involved on gastric secretion under various types of stress [24].

In previous work [8] it was demonstrated that double doses (1,000 mg/Kg bw) of a WPC produced in pilot plant [10] protected the rat gastric mucosa from absolute ethanol lesions by decreasing the ULI in the order of 75%, based on a saline control.

More recent work [12,13] showed that one of the most protective whey protein to ethanol gastric mucosa lesion was α -lactalbumin. Santos [18] showed that bovine tendon type I collagen recuperated mucosa duodenal lesions caused by *Phaseolus vulgaris* lectins.

Castro et al. [19] demonstrated that collagen hydrolysates, both bovine and porcine inhibited ethanol ULI in rats, in the order of 50-60% at dosage of 750mg/Kg bw.

In the present report double doses (750 mg/Kg bw) of a WPI (Table 3) decreased ulcerative lesion index of 74% while the same dosage of porcine collagen hydrolysate (PCH) decreased ULI of 38%. However, bovine collagen hydrolysate (BCH) at a lower dosage of 200 mg/Kg bw decreased ULI of 43%, but at 1,500 mg/Kg bw a decrease was measured of 77%. Therefore it seems that BCH is more effective than PCH in protecting the rat gastric mucosa from ethanol lesions. The reasons for that was not yet clarified, even the amino acid profile presented a small difference with proline 0.5% higher for BCH comparing with PCH, and the mean molecular mass is lower for porcine collagen (2.2KDa), the main difference between these two source of collagens is the isoelectric range, which is much higher for porcine.

It is interesting to notice that the combination BCH/WPI (375:375 mg/ Kg bw), double doses, gave the same protection as 750 mg/Kg bw of WPI and 1,500 mg/kg bw of BCH, while the combination PCH/WPI (300:450 mg/Kg bw), double doses, gave a lower protection (42%) versus (76%) for the 375/ 375 WPI/ BCH combination. These data suggest a synergistic action between WPI and BCH which seems not to exist between WPI and PCH. Furthermore, this fact is of great interest if one considers that the bovine collagen is cheaper and more available than WPI.

Comparisons of data from Tables 1 and 2, suggest that from the various combinations of WPI with either BCH or PCH, the combination BCH/ WPI (375:375 mg/ Kg bw) showed the most interesting results from both the efficacy in reducing ULI and the economical point of view, as was already mentioned. The data also suggest an apparent superiority of the BCH over PCH in the protection of ethanol mucosal lesions.

In order to better understand how WPI and the collagen hydrolysates protect the gastric mucosa from the ethanol lesions, changes in gastrin, gastric mucus and the relative importance of sulfhydryl substances were considered.

The data in Table 4 show a significant decrease of gastrin ranging from about 35-47% as a consequence of gastric intubation of the various substances studied, always referred to physiological saline as the negative control.

The gastrin is a peptide hormone synthesized by endocrine cells located in the antrum region of the stomach and duodenum, entering the blood stream by the

portal system. Its production is stimulated mainly by free amino acids and peptides from foods reaching the stomach.

The main action of gastrin is the stimulation of acid secretion by the parietal cells of the stomach. The lowering of gastrin concentration in the blood plasma suggests a drop in acidity in the stomach content after gastric intubation of WPI and the collagen hydrolysates [25].

In addition to the stomach pH, gastrin liberation is also inhibited by a series of peptides of endogenous origin, the most important of them is the somatostatin [26]. Somatostatin is produced by the D cells, localized in the antral mucosa very near the G cells, which are responsible for the production of gastrin. Pharmacological administration of somatostatin is a potent inhibitor of gastric acid secretion by direct action on the parietal cells and indirectly by suppression of gastrin liberation. Other substances like prostaglandins, secretin, glucagon, calcitonin and an intestinal vasoactive peptide (IVP) may inhibit the liberation of gastrin [27].

Published work on the antiulcerogenic properties of α -lactalbumin, using the ethanol induction model [12, 13] showed that a single oral dose of 200 mg α La/ Kg bw promoted a very high increase of prostaglandin E₂ (PGE₂) in the rat stomach mucosa.

In a healthy stomach and duodenum there is a balance between the potential of gastric acid and pepsin to damage gastric mucosal cells and the ability of these cells to protect themselves from injury [28]. Disruption of the balance results in a breakdown of the normal mucosal defense mechanisms [29]. Several mechanisms

are believed to be important in protecting the gastric mucosa from damage including mucus formation, mucosal blood flow, cell renewal and bicarbonate production [30].

The extent of ethanol-induced damage to the rat gastric mucosa correlated with degranulating cell content [31], a source of neuropeptides and inflammatory mediators, including histamine and leukotrienes. Ethanol-induced ulcers were not prevented by antisecretory agents such as cimetidine but were inhibited by agents that enhanced mucosal defense factors such as PGE₂ [5].

A recent publication [32] reported that malnourished rats, born from females maintained on low protein diet (60g protein/ Kg diet), from the first day of pregnancy until the end of lactation, was less susceptible to ulceration of the gastric mucosa in the ethanol model of gastric ulcer when compared with rats from mothers fed a normal protein diet (170g protein/ Kg diet). Mucus production and PGE₂ formation increased in malnourished rats and exhibit a lower number of ulcers in acute experiments than the normal rats ($p < 0.05$). This difference was not seen in sub-chronic gastric ulceration (14d). In the current study, BCH at double doses showed that higher concentration of protein increased the percentage of ULI, differently from showing by Paula et al. [32].

The increase in mucus production by single doses intubation of the various protecting agents used in the present work (Table 5) ranged from 51.5% for the combination BCH/WPI (375:375 mg/Kg bw) to 267% for the combination PCH/WPI (150:600 mg/Kg bw). WPI alone (750 mg/Kg bw) increased mucus production of 169% and PCH, at the same dosage, showed an increase of 158%.

The combination of PCH/WPI (150:600 mg/Kg bw) showed a very high efficiency as far as mucus production stimulation. Mucus stimulation of 74% was also found for acute treatment of purified α -lactalbumin [13] at a dosage of 200mg/Kg bw.

Gastric mucus appears in three forms: soluble mucin present in pancreatic secretion; insoluble mucus (adherent) covering the cells of the mucosa; and the mucus originated from secretory cells located between apical cells [33].

The gastric epithelium is covered by a continuous viscoelastic mucus gel layer, which forms a physical barrier between the gastric lumen and the surface of apical cells [34]. The structural characteristics of this barrier are primary indicators of its physiological function and changes on its composition have been identified in gastrointestinal pathologies. The high molecular weight mucins are responsible for the viscoelastic properties of the mucus barrier. They are widely expressed in epithelial tissues and are characterized by variable number of repeated peptide sequences rich in serine, threonine, and proline which carry large numbers of *O*-linked oligosaccharide chains. Secreted and membrane associated forms of mucins have been found based on their function as extracellular viscous secretions or viscoelastic polymer gels or located as membrane anchoring molecules in the glycocalyx [34, 35].

In a study of collagen absorption [14] around 5-10% of ingested protein was absorbed as peptides 3-3.5KDa 6 hours after ingestion. Therefore, it may be possible that the collagen could provide peptides enriched with proline to regulate

mucins production in the mucosa. Bovine collagen amino acid profile presented more than 0.5% of proline than PCH (data not showed). This possibility permits to speculate that in the presence of an adequate pool of peptides the synthesis of mucins and mucus production could occur independently of prostaglandin stimulation.

Sulfhydryl compounds such as glutathione, protein sulfhydryls and cysteine have been reported as protecting the gastric mucosal from injury [6] what has been confirmed by some work done more recently [8,9,13].

In the present work (Table 6) it was shown that the % decrease in ULI noticed after a single dose intubation (acute treatment) of WPI, PCH, BCH or combination of them ranged from 43 to 62% in the absence of SH alkylation (NEM) and from 12 to 49% after pre-treatment with NEM. The importance of alkylation was more evident for WPI (richer in SH-groups) than for collagen or combination of WPI/collagen.

Sulfhydryl substances are naturally present in the mucosa. Furthermore WPI is rich in cysteine and also has the property of stimulating glutathione synthesis in various body tissues including the gastrointestinal mucosa [36, 37].

CONCLUSION

The mixture WPI/ BCH at the proportion of 375:375 mg/Kg bw presented the best result, which decreased ULI of 64%. The collagen hydrolysates, both porcine and bovine, presented stronger effect in mucus production, WPI effect was more dependent of sulfhydryl compounds, resulting in more protective effect when the two proteins were administrated together.

REFERENCES

- [1] Melo JRC, Castro JP, Lanna JCBD, Guimarães JT, Sobrinho JMDL. Anatomia do estômago e anatomia do desenvolvimento. In: R. Dani; L.P. Castro (Eds). Gastroenterol Clín. 1993; vol 1:449-59, 3^a Ed., Guanabara Koogan S.A; Rio de Janeiro, Brasil.
- [2] Kontareck SJ. Mechanisms of gastroprotection. Scand J Gastroenterol. 1993; 174 (Suppl):15-28.
- [3] Abdel-Salam DME, Czimmer J, Debrececi A, Szalesanyi J, Mòsik G. Gastric mucosal integrity: Gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. J Physiol. 2001; 95:105-27.
- [4] Allen A, Flemström G, Garner A, Navilaasko E. Gastroduodenal mucosal protection. Physiol Rev. 1993; 73:823-57.

- [5] Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypotonic and thermal injury. *Gastroenterol.* 1979; 77:761-67.
- [6] Szabo S, Nagy L, Pavebani M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteinases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta.* 1992;206:95-105.
- [7] Oates PJ, Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterol.* 1988; 94:10-21.
- [8] Rosaneli CF, Bighetti AE, Antônio MA, Carvalho JE, Sgabieri VC. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. *J Med Food.* 2002; 5:221-28.
- [9] Rosaneli CF, Bighetti AE, Antônio MA, Carvalho JE, Sgabieri VC. Protective effect of bovine whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. *J Med Food.* 2004; 7: 309-14.
- [10] Zinsly PF, Sgabieri VC, Jacobucci HB, Pacheco MTB, Baldine VLS. Produção piloto de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Braz J Food Technol.* 2001;4:1-8.
- [11] Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol

- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosc Biotechnol Biochem.* 2001; 65:1104-11.
- [12] Ushida Y, Shimokawa Y, Matsumoto H, Toida T, Hayasawa H. Effects of bovine α -lactalbumin on gastric defense mechanisms in naive rats. *Biosc Biotechnol Biochem.* 2003; 67:577-83.
- [13] Mezzaroba LFH, Carvalho JE, Ponezi NA, Antônio Ma, Monteiro KM, Possenti A, Sgabieri VC. Antiulcerative property of bovine α -lactalbumin. *Intern Dairy J.* 2006;16:1005-12.
- [14] Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of 14 C labelled gelatin hydrolisate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J of Nutr.* 1999; 129:1891-95.
- [15] Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res.* 2003; 311: 393-99.
- [16] Nakajima I, Muroya S, Tanabe R-i, Chikuni K. Positive effect of collagen V and VI on triglyceride accumulation during differentiation in culture of bovine intramuscular adipocytes. *Differentiat.* 2002;70:84-91.
- [17] Das D, Banerjee RK. Effects of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Molec Cell Biol.* 1993;125:115-25.

- [18] Santos CDI. Ação do Colágeno extraído de tendões bovinos (colágeno tipo I) na recuperação de lesões da mucosa duodenal induzidas por lectinas de feijão (*Paseolus vulgaris*). Dissertação de Mestrado. 1992. Departamento de Ciência da Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- [19] Castro GA, Sgarbieri VC, Carvalho JE, Tinti S, Possenti A. Protective effect of collagen derivates on ulcerative lesions caused by oral administration of ethanol. J Med Food 2007 Mar 10(1): 154-8.
- [20] Maubois JL, Olivier G. Extraction of milk protein. In: Food proteins and their applications. Marcel Dekker Inc.1997. NY, CH:579-95.
- [21] Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. Memórias do Instituto Osvaldo Cruz. 1991; 86:137-9.
- [22] Slingerland DW, Carderalli JA, et al. The utility of serum gastrin levels in assessing the significance of low serum vitamin B12 levels. Arch Intern Med.1984; 144:1167-68.
- [23] Corne SJ, Morrissey SM, Woods RJ. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. J Physiol. 1974; 242:116-17.

- [24] Robert A. Effects of drugs on gastric secretion. In: Johnson LR, (Ed). Physiology of the gastrointestinal tract. 2nd. Edn. Raven Press, N.Y. 1987; 1071-88.
- [25] Walsh JH. As funções fisiológicas e patológicas da gastrina. In: Conceitos Básicos em Gastroenterologia. Smithkline. 1987:1-56.
- [26] Philip J, Domschke S, Domscke W. Inhibition by somatostatin of gastrin release and gastrin acid responses to meals and to pentagastrin in man. Scand J Gastroenterol. 1977; 12:261-65.
- [27] Polack JM, Bloom SR. Regulatory peptides of the stomach. In: Konturek SJ, Domschke W (eds). Gastric secretion. Basic and Clinical Aspects, N.Y. Thieme-Stratton. 1981:1-9.
- [28] Bagchi M, Milnes M, Williams C, Balmoori J, Ye X, Stahs S, Bagchi D. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and protective ability of novel grape seed *Proanthocyanidin* extract. Nutr Res. 1999; 19: 1189-199.
- [29] Forsell H. Gastric mucosal defense mechanisms: a brief review. Scand J Gastroenterol Suppl. 1988; 155: 23-8.
- [30] D' Souza RS, Dhurne VG. Gastric cytoprotection. Indian J Physiol Pharmacol. 1991; 35:88-98.

- [31] Diel F, Szabo S. Dose-dependent effects of linear and cyclic somatostatin on ethanol-induced gastric erosions: the role of mast cells and increased vascular permeability in the rat. *Regulat Pept.* 1986; 13: 2735-43.
- [32] Paula ACB, Gracioso JS, Toma W, Bezerra R, Saad MAJ, De Lucca IMS, Carneiro EM, Souza Brito ARM. Is gastric ulceration different in normal and malnourished rats? *Brit. J Nutr.* 2005; 93: 47-52.
- [33] Mojzis J, Hegedusova R, Mirossay L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosa injury in rats. *Physiol. Res.*, 2000; 49:441-46.
- [34] Flemström G, Hällgren A, Nylander O, Engstrand L, Wilander E, Allen A. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 1999; 277:G375-G382.
- [35] Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of the gastrointestinal disease. *Gut*, 2000; 47:589-594.
- [36] Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. *Revist Nutri.* 2004; 17: 397-409.
- [37] Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Medic Rev.* 2004; 9: 136-55.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support given by Gelita South America, Cotia, SP, and the CPQBA (State University of Campinas) providing the technical support.

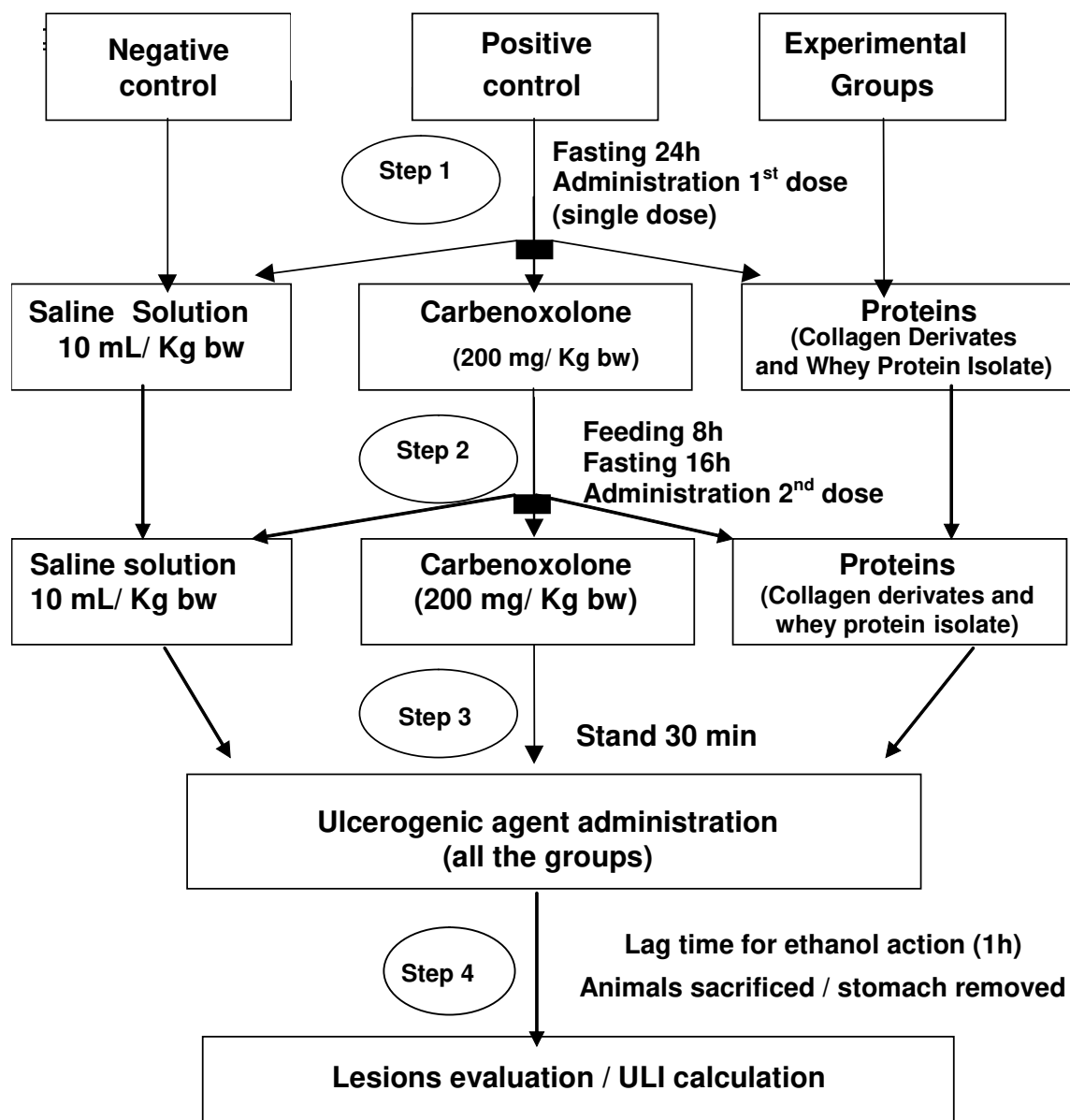


Figure 1. Experimental ulcerogenesis protocol.

Table 1. Effect of various combinations of whey protein isolate (WPI) and bovine collagen hydrolysate (BCH), single dose, in reducing the ULI in rats.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	%Reduction of ULI
Saline (a)	-	21	105.7 $\pm$ 25.5	
Carbenoxolone	200	16	20.0 $\pm$ 5.8 ***	81.0
BCH/ WPI	187/ 187	6	60.8 $\pm$ 14.7***	42.5
BCH/ WPI	375/ 375	6	37.7 $\pm$ 14.1***	64.4
BCH/ WPI	200/ 175	6	82.4 $\pm$ 17.5*	22.0
BCH/ WPI	200/ 550	6	57.7 $\pm$ 17.9***	45.4
BCH/ WPI	200/ 800	6	39.0 $\pm$ 7.5***	63.1
BCH/ WPI	200/ 1300	6	47.0 $\pm$ 10.3***	55.5

Anova $F_{(7,64)} = 37.41$; $p^{***} < 0.0001$. Tukey's test, $*p < 0.05$; $***p < 0.001$, referred to saline. (a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw.

Table 2. Effect of various combinations of whey protein isolate (WPI) and porcine collagen hydrolysate (PCH), single dose, in reducing the ULI in rats.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	% Reduction of ULI
Saline (a)	-	21	105.7 $\pm$ 25.5	
Carbenoxolone	200	16	20.0 $\pm$ 5.8 ***	81.0
PCH/ WPI	187/ 187	6	72.8 $\pm$ 37.0**	31.1
PCH/ WPI	375/ 375	6	46.3 $\pm$ 16.6***	56.2
PCH/ WPI	150/ 600	6	44.8 $\pm$ 17.8***	57.6
PCH/ WPI	300/ 450	11	59.2 $\pm$ 21.6***	44.0
PCH/ WPI	450/ 300	6	55.0 $\pm$ 15.0***	47.9
PCH/ WPI	600/ 150	6	65.2 $\pm$ 28.2***	38.3

Anova $F_{(7,69)} = 21.78$; $p^{***} < 0.0001$. Tukey's test, $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$, referred to saline. (a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw.

Table 3. Effect of various treatments (double-doses) of whey protein isolate (WPI) and bovine (BCH) or porcine (PCH) collagen hydrolysates in reducing the ULI in rats.

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean $\pm$ sdm)	% Reduction of ULI
Saline (a)	-	11	113.9 $\pm$ 23.0	
Carbenoxolone	200	8	22.4 $\pm$ 4.7***	80.4
BCH	200	6	64.5 $\pm$ 20.5**	43.4
BCH	1500	5	25.8 $\pm$ 10.8***	77.4
PCH	750	8	70.1 $\pm$ 17.3**	38.4
WPI	750	6	29.2 $\pm$ 16.1***	74.3
BCH/ WPI	375/ 375	6	27.2 $\pm$ 13.6***	76.1
PCH/ WPI	300/ 450	6	65.7 $\pm$ 19.4**	42.4

Anova $F_{(7,42)} = 28.00$; $p^{***} < 0.001$. Tukey's test, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$, referred to saline. (a) Saline dosage of 10 mL/ Kg bw.

Table 4. Effect of whey protein isolate (WPI), bovine collagen hydrolysate (BCH), porcine collagen hydrolysate (PCH) and combination of WPI with either PCH or BCH on decreasing plasma gastrin in rats intubated with ethanol (1mL/ rat).

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	Gastrin (pg/mL plasma)	% Decrease of Gastrin
Saline (a)	-	146.2±60.4	
Carbenoxolone	200	89.5±19.4 **	38.8
WPI	750	90.2±10.3**	38.3
PCH	750	84.2±6.8**	42.4
BCH	200	88.0± 11.8**	39.8
BCH/ WPI	375/ 375	94.3± 15.0**	35.5
PCH/ WPI	150/ 600	77.0± 8.5***	47.3

Anova $F_{(7,35)} = 5.56$; $p^{***} < 0.001$. Dunnet test $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. (a)

Saline (0.9% NaCl) dosage of 10 mL/ Kg bw.

Table 5. Effect of carbenoxolone (CBX), whey protein isolate (WPI), bovine collagen hydrolysate (BCH), porcine collagen hydrolysate (PCH) and combinations of WPI with either PCH or BCH on stimulating gastric mucosa production of mucus in rats intubated with absolute ethanol (1mL/ rat).

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	Mucus (μ g alcian blue linked mucus/ g mucosa tissue)	%Increase referred to saline
Saline (a)	-	64.7 $\pm$ 10.0	
Carbenoxolone	200	192.9 $\pm$ 70.8**	198.0
WPI	750	173.9 $\pm$ 55.9**	168.5
PCH	750	167.3 $\pm$ 40.4**	158.5
BCH	200	102.8 $\pm$ 40.8*	58.9
BCH/ WPI	375/ 375	98.0 $\pm$ 23.0*	51.5
PCH/ WPI	150/ 600	237.7 $\pm$ 33.0***	267.4

Anova $F_{(6,22)} = 8.60$; $p^{***} < 0.0001$. Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(a) Saline intubation 10 mL/ Kg bw.

Table 6. Effect of non-protein sulfhydryl groups alkylation against anti-ulcerogenic activity of bovine collagen hydrolysate (BCH), porcine collagen hydrolysate (PCH) and whey protein isolate (WPI), in various amounts and combinations, against ulcerative lesions caused by absolute ethanol (1mL/ rat).

Intragastric intubation	dosage (mg/Kg bw)	ULI (mean $\pm$ sdm)	%Decrease ULI	
			(a)	(b)
Saline ^(a)		120.5 $\pm$ 30.3	(a)	
Saline + NEM ^(b)		144.3 $\pm$ 36.1		(b)
BCH	200	64.2 $\pm$ 23.4**	46.7	
BCH + NEM	200	135.3 $\pm$ 24.9 ^{ns}		12.3
BCH	1,500	63.2 $\pm$ 7.2**	47.5	
BCH + NEM	1,500	122.7 $\pm$ 38.9 ^{ns}		14.9
PCH	750	69.0 $\pm$ 14.7**	42.7	
PCH + NEM	750	100.8 $\pm$ 21.6*		30.1
WPI	750	45.2 $\pm$ 9.9***	62.5	
WPI + NEM	750	125.7 $\pm$ 24.9 ^{ns}		12.9
WPI/ PCH	600/ 150	56.2 $\pm$ 19.2**	53.4	
WPI/ PCH + NEM	600/ 150	73.5 $\pm$ 17.5***		49.0
WPI/ BCH	375/ 375	68.3 $\pm$ 28.3**	43.3	
WPI/ BCH + NEM	375/ 375	87.8 $\pm$ 22.0**		39.1

Anova $F_{(13,79)} = 10.83$; $p^{***} < 0.0001$. Tukey`s test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(a) Saline intubation 10 mL/ Kg bw. (b) Saline intubation 10 mL/ Kg bw followed by N-ethylmaleimide subcutaneous injection.

CAPÍTULO IV: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS PRODUZIDAS PELAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO E DERIVADOS DE COLÁGENO EM MODELOS TUMORAIS “IN VITRO E IN VIVO”

Artigo 1: “Broad in Vitro Efficacy of Whey Protein Isolate (WPI) and Collagen Hydrolysates Against B16F10 Melanoma Cells”.

A ser publicado no Cancer Letters.

Artigo 2: “In Vivo Anti-tumoral Activity of Different Dietary Proteins on Melanoma B16F10 in the Presence or Absence of a Chemotherapeutic Treatment”

A ser publicado no Nutrition and Cancer, An International Journal

Artigo 3: “Analysis of Cell Cycle Phases and of Proliferative Capacity in Mice Bearing Melanoma, Maintained on Different Dietary Proteins”.

A ser publicado no Journal of Cutaneous Pathology

Broad *in vitro* Efficacy of a Whey Protein Isolate (WPI) and Collagen Hydrolysates, Against B16F10 Melanoma Cells¹.

Geórgia A. Castro,¹ Durvanei A Maria,² Valdemiro C. Sgarbieri¹

¹Food and Nutrition Department, Food Engineering Faculty, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Biochemistry and Biophysics Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil.

Short title: Collagen Hydrolysates, Melanoma Cell Division and Cell Phases.

Abstract

The main objective of this research was to investigate the inhibitory capacity on B16F10 melanoma cells proliferation and the influence on the cell cycle phases distribution (%) in a specific RPMI-1640 medium in the absence (control) or presence of various concentrations of a bovine collagen hydrolysate (BCH), porcine collagen hydrolysate (PCH) and the fractions of both (BCH-P1, BCH-P2, BCH-P3 and PCH-P1, PCH-P2, PCH-P3), respectively. The fraction BCH-P1 was further fractionated (microfiltration membranes) into five fractions (R1 to R5) and into four fractions (F1 to F4) by reverse phase chromatography.

The hydrolysate and all their fractions were comparatively tested to a negative control (B16F10 cells in the culture medium only) and with a whey protein isolate (WPI) plus B16F10 cells in the culture medium, as positive control. The samples concentration for 50% in vitro B16F10 growth inhibition (IC_{50}) by the studied preparations ranged from 0.19 to 156.9 mg/mL of protein in culture medium. The most inhibitory samples were the hydrolysate fractions BCH-P1, F1, F2, F3 and F4 with IC_{50} concentrations below 1mg/mL. Changes in cell cycle phases were characterized by a general decrease in G2/M phase what emphasizes a growth arrest, some increase in phase S (BCH-P1 and F4) but a strong increase in G0/G1 phase for BCH-P1 and F4. Caspase-3 expression increased significantly in all F and R fractions in addition to BCH and WPI containing media. Apoptosis was extremely high at low concentration (400 μ g/mL) of the F1, F2 and F3 fractions.

It is suggested that one of the mechanisms for the inhibition of tumorigenesis by the various bovine collagen hydrolysate fractions and WPI may be through the caspases cascade and apoptosis.

Key words: citotoxicity, collagen hydrolysates, whey protein isolate, tumorigenesis, B16F10 melanoma, efficacy

1. Introduction

Melanoma skin cancer type is responsible for about 4% of the skin cancer detected, which corresponds to 25% of the total malignant tumor registered in Brazil [1, 2].

Investigations have been made using techniques in biological, molecular and cellular metabolism areas to make easier the diagnostic and treatments. The cancer susceptibility depends on individual metabolism to carcinogenic compounds, DNA repairing capacity, proto-oncogenes alterations, tumor suppression genes and immunologic factors [2].

The metastasis of malignant tumor involves cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, which regulates the expression and enzymes localization. Biochemical, molecular and cellular processes regulate the tumor metastasis [3]. The metastasis involves a cascade of interdependent events that permit *in vitro* and *in vivo* investigations to evaluate individual cellular processes including adhesion, invasion, migration and proliferation [4].

The triple helical conformation of the collagenous domain plays a critical role in some of the interactions to promote melanoma cell adhesion, migration and invasion [5]. The collagen epitope mAb HUIV26 had little effect on tumor cell migration on either native or denatured collagen type I [4].

The malignant tumor cells invasion establishes contact with extracellular matrix proteins, including fibrillar collagen. In addition to provide physical barrier against invasion, fibrillar collagen also restricts proliferation. It has been assumed

that the regulatory growth results of an indirect restrictive effect on cell spreading and cytoskeletal organization [6].

Bovine collagen type I (BIC) binds to several cell surface receptors, which include scavenging receptor, discoidin domain receptor, integrins and cell adhesion receptors. The P13-kinase and MKK1-mediated negative regulation by BIC in cell proliferation [7].

Ito et al. [8] demonstrated *in vitro*, that porcine skin gelatine presented anti-tumoral effect on MH134 murine hepatoma cells, inducing programmed cell death (apoptosis).

Whey proteins have been researched extensively in the prevention and treatment of cancer. Many animal studies have examined the effects of whey protein concentrate and some of its components including lactoferrin and β -lactoglobulin in its immune enhancing activity and colon cancer inhibition [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Tsai et al. [15] demonstrated that a specific whey protein isolate (Immunocal) developed and patented in Canada enhanced the cytotoxicity effect of anticancer drugs.

Regarding molecular interactions involving cell cycle related proteins, retinoblastoma (Rb) and tumoral suppressor protein (p53), various growth signaling molecules, and their inhibitors are involved. Many of these molecular interactions also affect cell differentiation and apoptosis, cellular processes that are related to but often considered separately from cell cycle progression [16]. Effectors caspases, as caspase 3, are activated leading to cell destruction through

apoptosis. Depending on cellular death signaling involved, this process seems to happens through route of mitochondrial dysfunction and cytochrome C release, or alternatively through independent mitochondrial route [17].

In this investigation, the anti-tumoral effect of whey protein isolate (WPI) and collagen derivates (hydrolysate fractions) were comparatively studied on B16F10 melanoma cells *in vitro*, with respect to percentage cytotoxicity, cell cycle phases and possible mechanisms involved on this anti-proliferate effect. The investigation of these two classes of proteins is justified due to their likely complementary functions from both nutritional and physiological point of view probably providing different mechanisms of bioactivity.

2. Material and methods

2.1. Materials

Collagen derivatives (hydrolysates obtained from bovine and porcine skin raw materials) supplied by Gelita Group (Gelita South America), Cotia, São Paulo, Brazil and their derivatives obtained from molecular sieve and reverse phase chromatographic fractionation were used. The fractions obtained through molecular sieve from bovine collagen hydrolysate (BCH, mean MM 3 KDa) and porcine collagen hydrolysate (PCH, mean MM 2.2 KDa), respectively, are: bovine collagen hydrolysate fraction P1 (BCH-P1, mean MM 2.5 KDa), bovine collagen hydrolysate fraction P2 (BCH-P2, mean MM 1.7 KDa), bovine collagen hydrolysate fraction P3 (BCH-P3, mean MM 1.4 KDa), porcine collagen hydrolysate fraction P1 (PCH-P1,

mean MM 2.2 KDa), porcine collagen hydrolysate fraction P2 (PCH-P2, mean MM 1.6 KDa), porcine collagen hydrolysate fraction P3 (PCH-P3, mean MM 1.4 KDa). From BCH-P1 were also obtained five retentates using ultrafiltration membranes (UFC- Millipore) with 50KDa, 30KDa, 10KDa, 5KDa, 3KDa, respectively R1, R2, R3, R4 and R5. The permeate from the fifth membrane P5 (MM < 3KDa) was also evaluated. From BCH-P1 it was also obtained four fractions using reverse phase chromatography F1, F2, F3 and F4 (preparative column Vydac C₁₈).

The whey protein isolate (WPI) from bovine milk was produced in pilot plant scale using ultrafiltration technology [18]. Anti-tumor effect was investigated in melanoma cells B16F10 provided by the Ludwig-Swiss Institute, Switzerland.

2.2. Methods

All the collagen hydrolysate fractions already mentioned and also whey proteins were evaluated *in vitro*, in order to select the collagen fractions which presented stronger inhibition to melanoma B16F10 cell growth [19, 20, 21,22].

2.3. Murine tumoral strain culture [21, 22, 23]

The cell culture of murine melanoma B16F10 was cultivated in flasks with 75cm³ in a medium of RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% of fetal bovine serum inactivated (Cultilab), 2mM of L-glutamine (Sigma Chemical Company), 1mM sodium pyruvate and the antibiotics streptomycin 0.1mg/mL and ampicilin 0.1 mg/mL (Fontoura Wyeth AS). Before adherence, the cells were cultivated to multiply and maintain the strain, in order to be frozen in a medium of RPMI-1640

with 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Company) stored in liquid nitrogen.

The adherent cells suspensions (B16F10) were obtained by treating with trypsin 0.2% in culture flasks for 5 minutes and then inactivated in fetal bovine serum at 10%. The non-adherent cells were centrifuged twice then resuspended in the medium RPMI-1640 supplemented. For the cells counting a Malassez camera was used. Cell concentration was adjusted to 5×10^5 cells/mL in a medium RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 7g of Polimixin-B (Sigma Chemical Company, St Louis Mo-USA). The cell viability was determined through the exclusion test using Tripan Blue, and was superior to 95% viable cells.

2.4. Experimental test

The samples evaluated were whey protein isolate and different collagen fractions at concentrations from 6mg/mL to 100mg/mL. The optical density was measured using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) methodology [24]. In a second stage, only the collagen fraction which seemed to present higher cytotoxicity and/or anti-proliferation or apoptotic effect and whey protein isolate were analyzed at concentrations from 0.98µg/mL to 6mg/mL and also at high concentrations of 500mg/mL; 200mg/mL and 100mg/mL, using the sample as a coating or as a matrix in a flask. The cell viability was measured after 24 and 48 hours of incubation. The proliferative or apoptotic effect

of the samples were evaluated by applying the samples above or below the tumor cells.

2.5. Cellular adhesion

Confluent cultured monolayer melanoma B16F10 cells were treated with different concentrations of bovine collagen hydrolysate and fractions (0.98 µg/mL–100mg/mL) or porcine collagen hydrolysate and fractions (100mg/mL–0.98 µg/mL) and whey protein isolate (WPI) at the same concentrations range. The cytological alterations were analyzed 15 min to 24 h after treatments, captured by inverse microscopy (Leitz Diaplan, Germany) and visualized through CCD-IRIS, Color Video Camera (Sony Co.), Cyto Viewer Lite Program. Cell viability was evaluated by exclusion trypan blue staining. Adherent cells were fixed with 0.1% glutaraldehyde, washed in phosphate buffer, stained with crystal violet, lysed and measured at 620 nm absorbance in ELISA counter (Titertek Multiskan). Plates with 96 flat wells were coated overnight at 37°C with different concentrations of bovine collagen derivatives (hydrolyzed fractions), porcine collagen derivatives or whey protein isolate, following three washes with Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) for 30 min at 2°C.

2.6. Determination of cytotoxicity assay - MTT

Tumoral cell strains viability after treatment with different collagen hydrolysate and fractions and WPI, concentrations from 0.98µg/mL to 100mg/mL, were

determined using colorimetric methodology MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), as described [24]. This method is based on MTT reduction to formazan by the cells alive. The determination of sensitivity of different dosages was optimized according to standards already established by the National Cancer Institute (NCI), USA [24]. The non-viable cells were determined using tumor cells suspensions under sterile conditions, incubated in plates with 96 wells. To these cells 10 μ L of MTT (5mg/mL) was added, and then incubated for 3 hours in an oven containing 5% of CO₂ at 37°C. After this period, the medium was removed and 100 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to dissolve formazan crystals formed and precipitated. The absorbance was read using ELISA assay at a wave length of 540 nm (TiterTek Multiskan).

2.7. Determination of cell cycle phases

Flow cytometry was applied to study cell cycle, which permitted to determine the kinetic parameters of cell population and provide the percentage of cells that were in phases G₀/G₁, S, G₂/M and apoptosis. Samples of tumor cells treated with collagen hydrolysates and whey proteins and also non-treated sample were collected and frozen immediately in sodium citrate (2mM), sucrose 25 mM and 0.05% dimethylsulfoxide (DMSO), and stored in liquid nitrogen until the moment of use [25]. After defrosting in ice bath the cells were incubated with 375 μ L of trypsin (Sigma) 0.03 g/L for 10 minutes at room temperature and neutralized using trypsin inhibitor (Sigma) 0.5 g/L, ribonuclease A (Sigma) 0.1 g/L and espermine (Sigma)

1.2 g/L. The samples were transferred to tubes of a flow cytometer and the cell counting at different cell cycle stage, apoptosis level (Sub-G1) and DNA content at S phase were obtained using Software Mod-fit. (Becton-Dickson) [26].

2.8. Determination of caspase expression using flow cytometry

The same procedure used for cell cycle phase determination was also used in the caspase-3 (E-8): SC-7272 kit from Santa Cruz Biotechnology, INC and caspase inhibitor Ac-DEVD-CHO (catalog# G5961) from Promega Corporation, expression study.

2.9. Statistical analysis

Cell cycle phases, cell viability determination and all measurements performed were compared by one-way analysis of variance. Differences were expressed by $p < 0.05$. Differences in cell cycle phases and percentage of caspase expression were tested for statistical significance, using analysis of variance and differences among means by the Duncan's or the Tukey's test at $p < 0.05$. All the experimental data were expressed as the mean $\pm$ sdm.

3. Results

Table 1 shows the whole range of IC_{50} (substance concentration to inhibit 50% of cells replication) obtained from *in vitro* testing of several collagen hydrolysates and hydrolysate fractions on melanoma B16F10 cells.

Among the bovine collagen preparations some of them were very active showing IC_{50} inhibition at concentration below 1mg/mL in the culture media. Such preparations were: F2 (IC_{50} = 0.19mg/mL), 373 fold more active than the BCH, the original hydrolysate, and 36 times more active than the WPI; BCH-P1 (IC_{50} =0.31mg/mL), F1 (IC_{50} =0.34mg/mL), F3 and F4 (IC_{50} =0.42mg/mL).

The fractions obtained from BCH-P1 by RP-HPLC (F1-F4) were the most potent (IC_{50} from 0.19 to 0.42mg/mL) mean value of 0.34mg/mL, an average activity 208 times the BCH and 20 times the WPI inhibitory activity.

The porcine collagen hydrolysate PCH and its fractions (PCH-P1, PCH-P2, PCH-P3) did not show strong inhibitory activity toward the B16F10 melanoma cells.

An interesting feature of the collagen preparations and WPI, was that very low concentrations seemed to favor inhibition of B16F10 proliferation, more than higher concentrations (100 to 6 mg/mL) used in various of the experiments.

The equations from the IC_{50} calculations can be found in the appendix II.

The determination coefficients which appear in Table 1 reveal the high fit to the equations (all above 90%) except for the BCH-P2 equation with a 71.6% fit.

[Insert Table 1]

Through evaluation of cell adhesion B16F10 melanoma cells could not be adhered in cultured medium with all samples analyzed (bovine and porcine collagen hydrolysate and whey protein isolate). Therefore, the B16F10 melanoma cell proliferation is not promoted by the adhesion mechanism caused by these samples. The cell adhesion did not happen when bovine and porcine collagen

hydrolysates as well as WPI were used, therefore not leading to proliferation of B16F10 melanoma.

Figure 1 shows the percentage of cellular phases of BCH-P1 and its F fractions. The results indicates that G2/M phase decreased for all samples ($p < 0.05$) compared with control (medium with B16F10 cells) and BCH-P1 did not show statistical difference with all F fractions. The phase S (DNA synthesis) increased for BCH-P1 and F4 ($p < 0.01$), but for F1, F2 and F3 the percentage maintained the same as the control. Therefore, probably BCH-P1 and F4 possessed stronger proliferative mechanisms for B16F10 DNA synthesis. For the quiescent phase (G0/G1) only BCH-P1 showed an increase ($p < 0.001$) in relation to control, therefore even though proliferative activity was denoted, the cells remained longer period at quiescent phase. The percentage apoptosis (Figure 2) increased significantly ($p < 0.001$) for F1, F2 and F3 compared with the control. Indeed, these fractions exhibited significantly higher apoptosis than BCH-P1 and F4. Once more, BCH-P1 and F4 seemed to present different mechanism than F1, F2 and F3 in B16F10 melanoma tumor cells medium (Figure 2).

[Insert Figures 1 and 2]

The effect of concentration of BCH-P1, F3 and F4 in cellular phase percentage is illustrated in Figure 3. As the concentration of the samples increased the G0/G1 phase also increased and apoptosis decreased. This trend was observed for three samples evaluated.

[Insert Figure 3]

Figure 4 shows the percentage caspase-3 expression in B16F10 in the presence of BCH-P1, BCH, WPI and F fractions. All presented higher expression ($p<0.05$; $p<0.001$) compared with to the control B16F10 cells medium (a). The caspase-3 expression for WPI and BCH were similar significantly from BCH-P1 ($p<0.01$).

Percentage caspase expression for fractions F1, F2, F3 and F4 (Figure 4) presented no difference among themselves, but were different from BCH-P1 ($p<0.01$). However, it was not found difference (Figure 4) among the fractions (called “F”) and BCH ($p>0.001$). The sample BCH presented higher percentage of caspase expression than BCH-P1 ($p<0.05$).

Evaluating the IC_{50} values, cell cycle phase distribution and percentage caspase expression, the fractions obtained from reverse phase chromatography presented stronger bioactivity in B16F10 melanoma cell culture compared with BCH-P1 ($p<0.01$). Fractions F1, F2 and F3 which promoted a high percentage apoptosis, probably involved caspase-3 mechanism.

[Insert Figure 4]

The R fractions (Figure 5), obtained through molecular sieve fractionation, presented, high percentage of caspase-3 expression ($p<0.001$; $p<0.01$). However, R3, R4 and R5, presented the highest percentage caspase-3 expression and among R fractions did not differ from BCH and WPI. Therefore, the molecular sieve fractionation did not help to elucidate the mechanism of action for these fractions.

[Insert Figure 5]

Figure 6 shows the percentage of non-viable cells for WPI, BCH, BCH-P1 and its fractions (F) obtained through reverse phase chromatography and, (R fractions)

obtained through molecular sieve fractionation, at 400µg/mL using flow cytometry technique. It can be observed that all samples presented significantly higher number of non-viable cells than the control (B16F10 in culture medium). Highest percentages of non-viable cells were determined in BCH, BCH-P1 and R1. When BCH, BCH-P1 were compared with WPI no significant difference was found.

[Insert Figure 6]

In Figure 7, it is observed that all samples presented higher and significant percentages of apoptosis than the control (B16F10, medium only) and the R and F fractions did not show advantage to promote apoptosis of B16F10 cells compared with BCH and/or BCH-P1. The fractions R (obtained through molecular sieve fractionation) showed a trend toward higher apoptosis, as the molecular masses decreased from R1 to R5 fraction. By comparing BCH, BCH-P1 and WPI no significant difference was found.

[Insert Figure 7]

Overall the fractions F1 and F2 seemed to present some advantageous features when looking for inhibitory peptide against B16F10 cultured cells.

4. Discussions

Ito et al. [8] demonstrated *in vitro*, that porcine skin (PS) gelatine induced apoptosis in MH134 cells evaluated through flow cytometric analysis, agarose gel electrophoresis and electron microscopy. On the other hand, bovine bone (BB) gelatine did not induce apoptosis or necrosis. A significant difference in relation to

bioactivity on B16F10 melanoma cells was also observed between bovine and porcine collagen hydrolysates in the present study. BB gelatine suppressed proliferation of the cells much more weakly than PS gelatine, and BB gelatine did not induce apoptosis. Probably, these differences are according to the sequence of the amino acid [8]. In the current study, bovine collagen samples, mainly BCH-P1 and F fractions, presented lower IC_{50} than porcine collagen samples in B16F10 cell culture medium. It may due to isoelectric range, mean molecular mass and deamidation, which porcine collagen was not submitted (data not shown).

The concentration used of PS and BB [8] was 12.5mg/mL and 25mg/mL to evaluate apoptosis and necrosis in MH134 cell culture medium. This sample concentration range was also applied in present study to calculate IC_{50} .

Identification of peptide bioactivity is commonly conducted using micro and ultrafiltration and HPLC separation techniques [27]. Specific peptide sequences which are responsible for antioxidant activity from gelatin hydrolysate [28], opioide peptides from casein [29] and other bioactivities have been recognized.

In order to identify collagen sequence, enzymatic hydrolysis and chromatographic techniques as gel permeation and reverse phase have been applied [30, 31]. Specific cleavages promoted by chymotrypsin, pepsin and other enzymes allowed peptide identification [31, 29]. The commonly triplet sequence from collagen molecule is Gly-X-Y, where X is almost always proline [32]. This sequence with glycine is commonly found in collagen type I and III for both α chains ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) [33]. Collagen was already correlated with some bioactivities, as

inhibition of gastric ulcer lesions [34, 35, 36], tumorigenesis [4,5,6,8], what suggests its function in extracellular matrix and how it can influence the intra and extra cellular signals promoting differentiation, genetic changes, stimulation of specific enzymatic cascades, apoptosis and other molecular and cellular mechanisms [23]. It was shown [6] an inhibitory effect of fibrillar collagen on human melanoma and fibrosarcoma cells proliferation involving activation of the tyrosine kinase discoidin domain receptor 2 which is independent of effects on cell spreading. Cells plated in the presence of fibrillar collagen showed growth arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle [6].

In the present study, a similar effect was observed for BCH-P1, however for the fractions F1, F2 and F3 the same effect was not observed. The phase G2/M decreased for all samples analysed (BCH-P1 and all four F fractions). In spite of BCH-P1 arresting at G0/G1 phase, the phase S increased and G2/M decreased compared with control medium. The DNA duplication probably happened, but the mitose was not promoted.

It was also demonstrated [7] that P13-kinase and the MAP kinases, including JNK and ERK, were involved in the restriction of G1 and S phases in the cell cycle by bovine collagen type I (BIC) in culture of Raw264.7 cells via cyclins D1, A, and B1.

In the present study, fractions F1, F2 and F3 did not present significant reduction for S, but G2/M phase reduced significantly comparing to control medium. The phase G0/G1 did not increase its percentage, however, apoptosis percentage increased significantly for these same fractions (Figures 1 and 2).

In the process of apoptosis, cells lose their phospholipid membrane asymmetry and expose phosphatidylserine at the cell surface. Annexin V is a phospholipid-binding protein with high affinity for phosphatidylserine, and is useful for identifying apoptotic cells with exposed phosphatidylserine. Necrotic cells were easily stained with propidium iodide (PI) as well as with annexin V whereas apoptotic cells stained only with annexin V [8].

In the current study, the F fractions (F1, F2 and F3) presented significant percentage of apoptosis, on the other hand, BCH-P1 decreased and F4 did not cause any change compared with control medium. These effects are likely to change according to dosage and the time of exposure. The concentration effect in cell cycle phases showed that as the sample concentration increased, the G0/G1 increased and apoptosis percentage decreased.

One set of mediators implicated in apoptosis belongs to the aspartate-specific cysteinyl proteases or caspases. Induction of apoptosis via death receptors typically results in the activation of an initiator caspase such as caspase 8 or caspase 10. These caspases can then activate the effector caspases, such as caspase 3 and caspase 6. These caspases are responsible for the cleavage of the key cellular proteins, such as cytoskeletal proteins that lead to the typical morphological changes observed in cells undergoing apoptosis. The caspases could be activated by granzyme B delivered into cells by cytotoxic T lymphocytes and cytochrome C from mitochondria [37].

In the present study, the expression of caspase-3 was measured and all samples presented significant differences from the control. For WPI, which seems

to present immune response against tumorigenesis, the caspase-3 could be activated by cytotoxic T lymphocytes (cellular immune response). Even the collagen samples, which do not seem to stimulate immune response, the expression of caspase-3 was significant, probably caused by a different mechanism of caspase activation. Considering the results obtained, F1 and F2 could represent a peptide sequence which could increase apoptosis through caspase-3 mechanism (caspase cascade).

As it was also demonstrated [5] the sequence of collagen $\alpha 3(\text{IV})$ NC1 domain inhibits melanoma cell proliferation, migration and invasion by decreasing metaloproteinases (MMP) production and activation. Peptide sequences from the $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, and $\alpha 3(\text{IV})$ chains have been shown to inhibit angiogenesis [5]. In recent study [4] it was already mentioned that in the presence of mAb HUIV26 (a cryptic epitope of collagen type IV), the mean number of B16F10 lung foci was significantly reduced by 65% ($p < 0.001$) as compared to no treatment or control antibody, suggesting that this inhibitory effect can occur early in the metastatic cascade.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support given by Gelita South America, Cotia, SP, and technical support provided by the Biophysics and Biochemistry Laboratory from Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil.

References

- [1] http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=333. Instituto Nacional de Câncer (INCA). 2006.
- [2] M.M. Brentani, F.R.G. Coelho, L.P. Kowalski, Bases da Oncologia, second ed., Lemar, Livraria Editora Marina e Tecmed Editora, 2003.
- [3] A. Klose, A.W. Hennes, P. Zigrino, E. Weber, T. Krieg, C. Mauch, N. Hunzelmann, Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native collagen I induces the release of mature cathepsin, British International Journal Cancer. 118 (2006) 2735-2743.
- [4] J.M. Roth, M. Caunt, A. Cretu, A. Akalu, D. Policarpio, Li Xiaolu, P. Gagne, S. Formenti, P.C. Brooks, Inhibition of experimental metastasis by targeting the HIUV26 cryptic epitope in collagen, American Journal Pathology. 168(5) (2006) 1576-1586.
- [5] S. Pasco, B. Brassart, L. Ramont, F.X. Maquart, J.C. Monboisse, Control of melanoma cell invasion by type IV collagen, Cancer Detection and Prevention. 29 (2005) 260-266.
- [6] S.J. Wall, E. Werner, Z. Werb, Y.A. DeClerk, Discoidin domain receptor 2 mediates tumor cell cycle arrest induced by fibrillar collagen, The Journal of Biological Chemistry. 280 (48) (2005) 40187-40194.
- [7] M.K. Cho, S.H. Suh, C.H. Lee, S.G. Kim, Bovine type I collagen inhibits Raw264.7 cell proliferation through phosphoinositide 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent down-regulation of cyclins D1, A and B1, Biochimica et Biophysica Acta. 1744 (2005) 47-57.

- [8] N. Ito, T. Kojima, H. Nagath, N. Ozeki, Y. Yoshida, T. Nonami, Apoptosis induced by culturing MH134 cells in the presence of porcine skin gelatin *in vitro*, Cancer Biotherapy Radiopharmaceutical. 17(4) (2002) 379-384.
- [9] C.L. Collins, M. Wasa, W.W. Souba, Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumour-derived breast cell lines, Journal Cell Physiology. 176(1) (1998) 166-78.
- [10] G. Bounous, M.M. Stevenson, P.A. Kongshavn, Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to salmonellosis, The Journal of Infectious Diseases. 144(3) (1981) 281-282.
- [11] R.E. Goodman, F.L. Schambacher, Bovine lactoferrin in RNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland, Biochemical and Biophysical Research Communications. 180(1) (1991) 75-84.
- [12] A. Hakanson, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, H. Sabharwal, C. Svanborg, Apoptosis induced by a human milk protein, Proceedings of the National Academic of Science. 92 (1995) 8064-8068.
- [13] N. Sakamoto, Antitumor effect of human lactoferrin against newly established human pancreatic cancer line SPA, Cancer and Chemotherapy. 10 (1998) 1557-1563.
- [14] K. Marshall, Therapeutic application of whey protein, Alternative Medicine Review. 9(2) (2004) 136-156.
- [15] W.Y. Tsai, W.H. Chang, C.H. Chen, F.J. Lu, Enhancing effect of patented whey protein isolate (immunocal) on the citotoxicity of anti-cancer drug, Nutrition and Cancer. 38(2) (2000) 200-208.

- [16] S.E. Shackney, T.V. Shankey, Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions, *Cytometry*. 35 (1999) 97–116.
- [17] E.A. Nigg, Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints, *Nat. Review Molecular Cell Biology*. 2(1) (2001) 21-32.
- [18] J.L. Maubois, G. Olivier, Extraction of milk proteins. In: *Food Proteins and their Applications*. (Eds.) Dekker, Inc, NY, CH, 1997, 579-595.
- [19] X. Zhang, H.M. Burt, G. Mangold, D. Dexter, D.V. Hoff, L. Mayer, W. Hunter, Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar plactaxel, *Anti Cancer Drugs*. 8 (1997) 696-701.
- [20] J. Plowman, D.J. Dyker, M. Hollingshead, Simpson-Herren, M.C. Alley, Human tumor xenograft models in NCI development, in *Anticancer Drug Development: Preclinical screening, Clinical trials and approved* (B.A Teicher ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997 101-125.
- [21] R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. Macdonald, A.M. Schumacher, B.J. Abott, *Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems*, third ed., Betheseda, Maryland, 1972 47-51.
- [22] E.J. Freireich, E.A. Geran, D.P. Rall, Quantitative comparison of toxicity of anti-cancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man, *Cancer Chemotherapy Rep*. 50 (1996) 219-245.
- [23] H. Carvalho, S.M.R. Pimentel, *A Célula* 2001, first ed, Manole, São Paulo, 2001 260-274.

- [24] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal Immunology Methods*. 16, 65 (1-2) (1983) 55-63.
- [25] L.L. Vindelov, I.J. Christensen, N.I. Nissen, A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis, *Cytometry* 3, 5, (1983) 323-327.
- [26] K. Vermeulen, R. Dirk, V. Bockstaele, Z. N. Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Proliferation* 36 (2003) 131–149.
- [27] S. Bouhallab, D. Mollé, J. Lèonil, Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides, *Biotechnology Letters*. 14, 9 (1992) 805-810.
- [28] S.K. Kim, Y. Tac Kim, H.G. Byun, K.S. Nam, D.S. Joo, F. Shahidi, Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin, *Journal Agriculture Food Chemistry* 49 (2001) 1984-1989.
- [29] O.R. Fenema, *Food Chemistry*, third ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- [30] W. Babel, R.W. Glanville, Structure of human-basement-membrane (type IV) collagen complete amino –acid sequence of a 914-residue-long pepsin fragment from the $\alpha 1(\text{IV})$ chain, *European Journal Biochemistry* 143 (1984) 545-556.

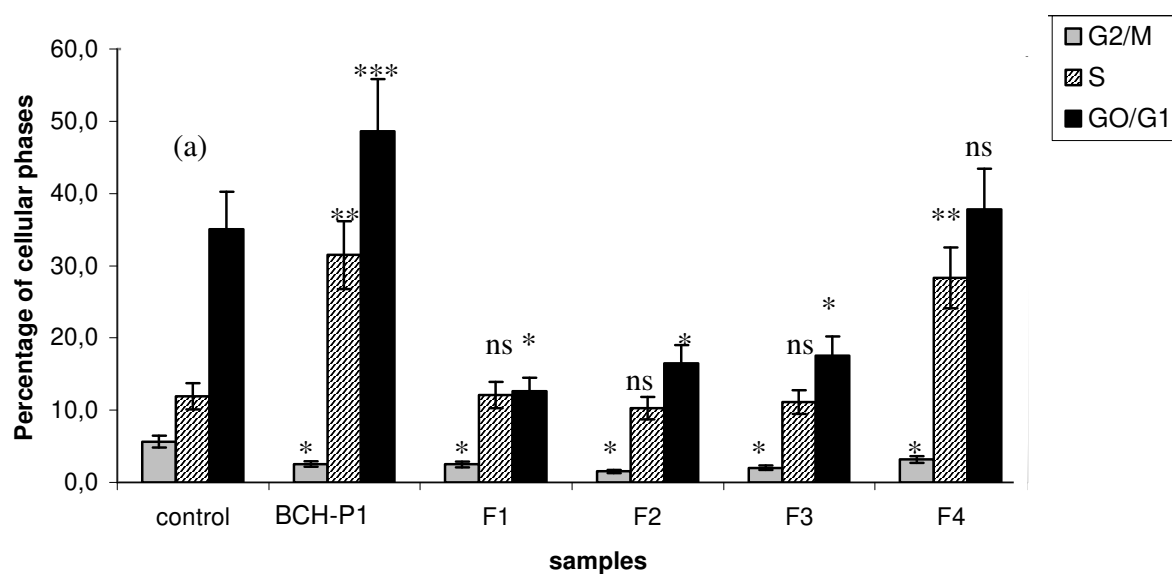
- [31] D.Brazel, I. Oberbäumer, H. Dieringer, W. Babel, R.W. Glanville, R. Deutzmann, K. Kühn, Completion of the amino acid sequence of the α 1 chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non-triplet interruptions located within the collagenous domain, European Journal Biochemistry.168 (1987) 529-536.
- [32] F.W.Kotch, R.T. Raines, Self-assembly of sybthetic collagen triple helices, PNAS. 103, 9 (2006) 3028-3033.
- [33] www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de. Search: bovine collagen; CO1A2_BOVIN (P02465), CO3A1_BOVIN (P04258); released May 30, 2000.
- [34] G.A. Castro, V.C. Sgarbieri, J.E. Carvalho, S. V. Tinti, A. Possenti, Protective effect of collagen derivates on the ulcerative lesions caused by oral admnistration of ethanol, Journal of Medicinal Foods. 10, 1 (2007) 154-157.
- [35] C.F. Rosaneli, A.E. Bighetti, M.A. Antônio, J.E. Carvalho, V.C. Sgarbieri, Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion, Journal of Medicinal Food. 5, 4 (2002) 225-232.
- [36] L.F.H. Mezzaroba, J.E. Carvalho, A.N. Ponezi, M.A. Antônio, K.M. Monteiro, A. Possenti, V.C. Sgarbieri, Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin, International Dairy Journal 16 (2006) 1005-1012.
- [37] S. Kothakota, Caspase 3-generated fragment of gelsolin:effector of morphological change in apoptosis, Science 278 (1997) 294-298
In:<http://www.bioscience.org/news/scientis/caspse.htm>

Table 1. Fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀) by collagen hydrolysates (CH) and a whey protein isolate (WPI) on cultured B16F10 melanoma cells.

Samples ^a	IC ₅₀ (mg/mL)	concentration range	R ²
BCH	70.87	100 - 6mg/mL	0.9467
BCH-P1	100.74	100 - 6mg/mL	0.9378
BCH-P1	0.31	1 - 0.002mg/mL	0.9782
BCH-P2	117.11	100 - 6mg/mL	0.7160
BCH-P3	72.42	100 - 6mg/mL	0.9535
R1	6.11	8 - 0.004mg/mL	0.9810
R2	2.10	8 - 0.004mg/mL	0.9873
R3	1.79	8 - 0.004mg/mL	0.9962
R4	3.65	8 - 0.004mg/mL	0.9724
R5	1.78	8 - 0.004mg/mL	0.9829
P5	2.35	8 - 0.004mg/mL	0.9899
F1	0.34	500 - 0.98ug/mL	0.9552
F2	0.19	500 - 0.98ug/mL	0.9951
F3	0.42	500 - 0.98ug/mL	0.9999
F4	0.41	500 - 0.98ug/mL	0.9965
PCH	83.20	100 - 6mg/mL	0.9161
PCH-P1	70.12	100 - 6mg/mL	0.9196
PCH-P2	156.88	100 - 6mg/mL	0.8549
PCH-P3	107.32	100 - 6mg/mL	0.9066
WPI	6.89	100 - 0.15mg/mL	0.9373

^a BCH: bovine collagen hydrolysate; BCH-P1: bovine collagen hydrolysate (fraction P1); BCH-P2, BCH-P3: bovine collagen hydrolysate (fractions P2 and P3). R1-R5: retentates of BCH-P1 on different ultrafiltration Millipore membranes; P5: permeate from R5. F1-F4: fractions from RP-HPLC chromatography of BCH-P1; PCH: porcine hydrolysate; PCH-P1, PCH-P2, PCH-P3 (fractions P1, P2, P3) from PCH; WPI: whey protein isolate. For regression equations for IC₅₀ (see Appendix II).

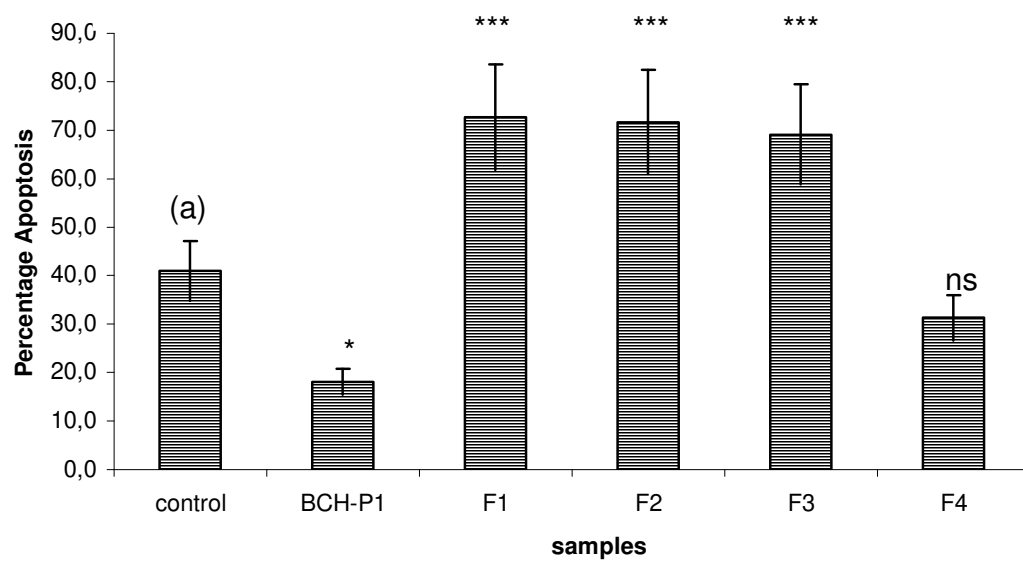
Figure 1. Cell cycle phases percentage of B16F10 cells determined in medium with BCH-P1 (bovine collagen hydrolyzed fraction – MM <80KDa, mean 2.5KDa) or one of its fractions obtained through reverse phase chromatography at 400µg/mL.



Anova $F_{(5,17)} = 1.175$ Dunnet's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in relation to (a).

(a) control, B16F10 melanoma cell, without test substance in the medium.

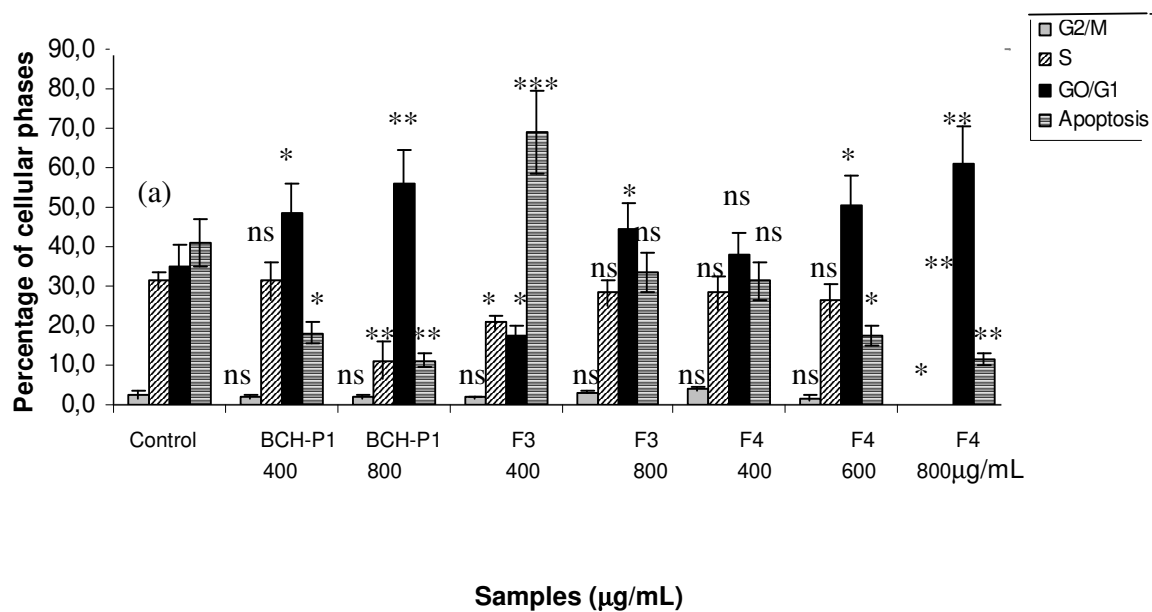
Figure 2. Apoptosis percentage of B16F10 determined in medium with BCH-P1 (bovine collagen hydrolyzed fraction – MM <80KDa, mean 2.5KDa) or one of its fractions obtained through reverse phase chromatography at 400µg/mL.



Anova $F_{(5,17)} = 1.175$ Dunnet's test $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ in relation to (a).

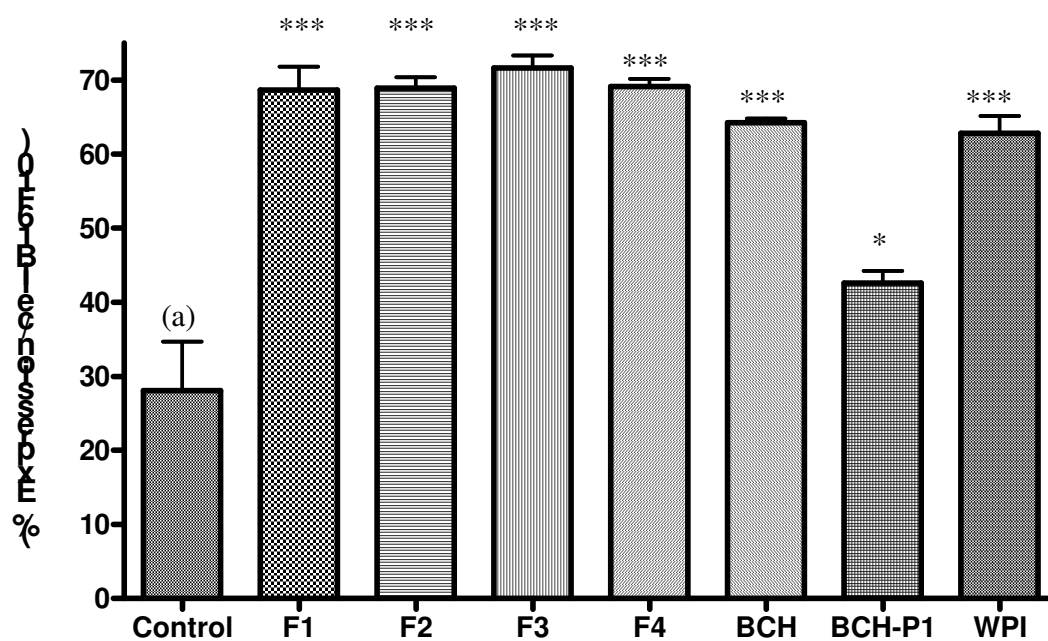
(a) control, B16F10 melanoma cell, without test substance in the medium.

Figure 3. Cell cycle phases percentage of B16F10 determined in medium at different concentrations with BCH-P1 (bovine collagen hydrolysate fraction – MM <80KDa, mean value 2.5KDa) or one of its fractions obtained through reverse phase chromatography.



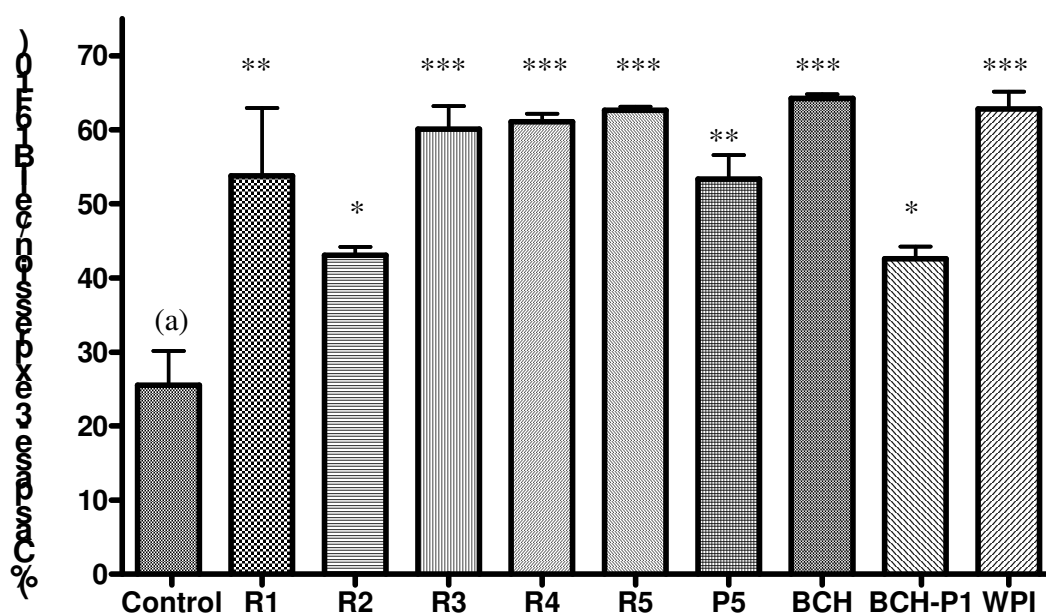
Anova $F_{(7,96)} =$ Dunnet's test $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ in relation to (a). (a) control, B16F10 melanoma cell, without test substance in the medium.

Figure 4. Percentage caspase expression per B16F10 melanoma cell in medium with collagen hydrolysate and their derivatives obtained through reverse column fractionation at 400µg/mL.



Tukey`s test at 95% of confidence interval; *p<0.05, ***p<0.001 in relation to (a). (a) control, B16F10 melanoma cell without test substance in the medium.

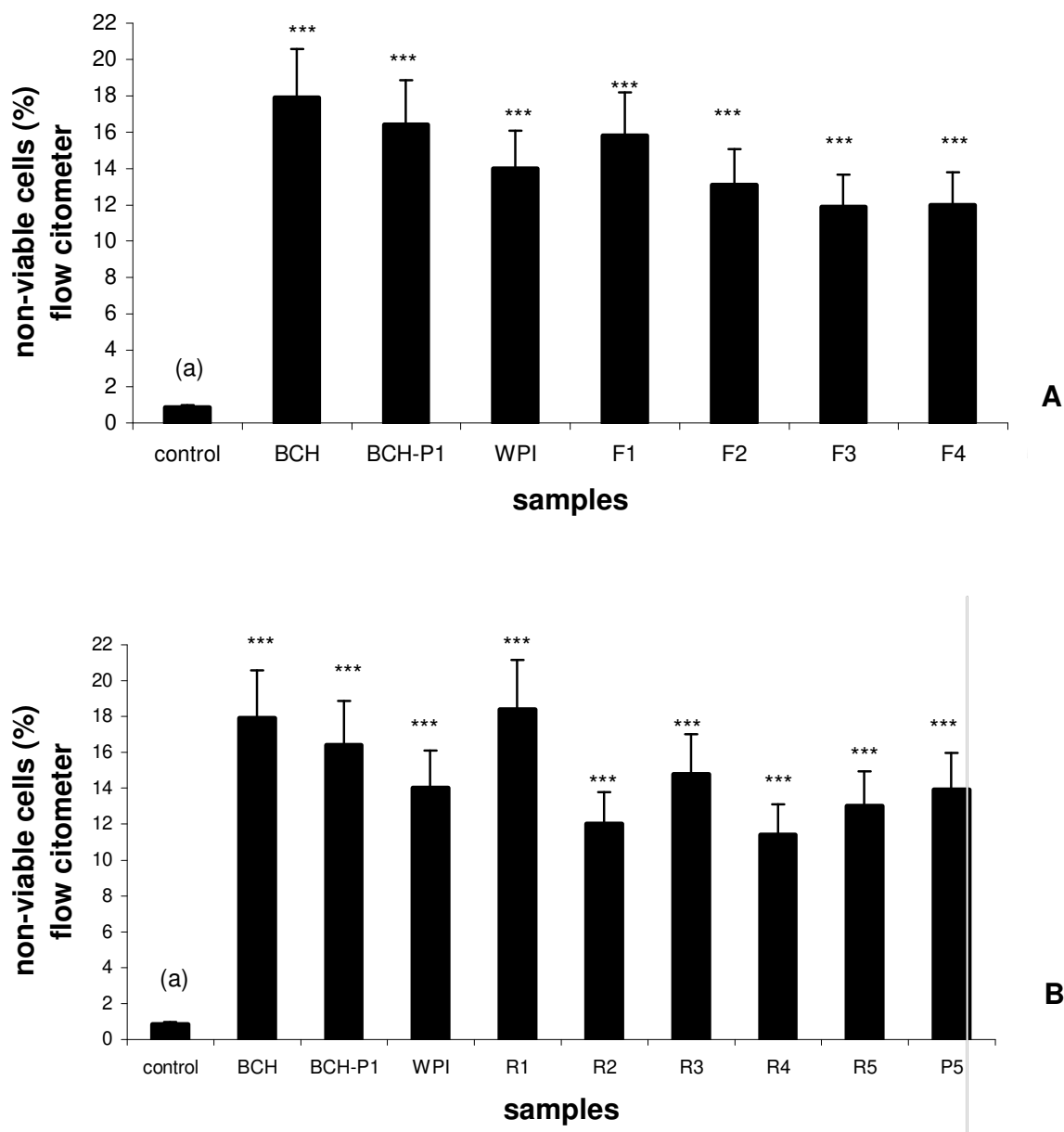
Figure 5. Percentage caspase expression of B16F10 melanoma cell in medium with collagen hydrolysate (BCH) and their derivatives obtained through molecular sieve fractionation at 400µg/mL.



Tukey's test at 95% of confidence interval; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in relation to (a).

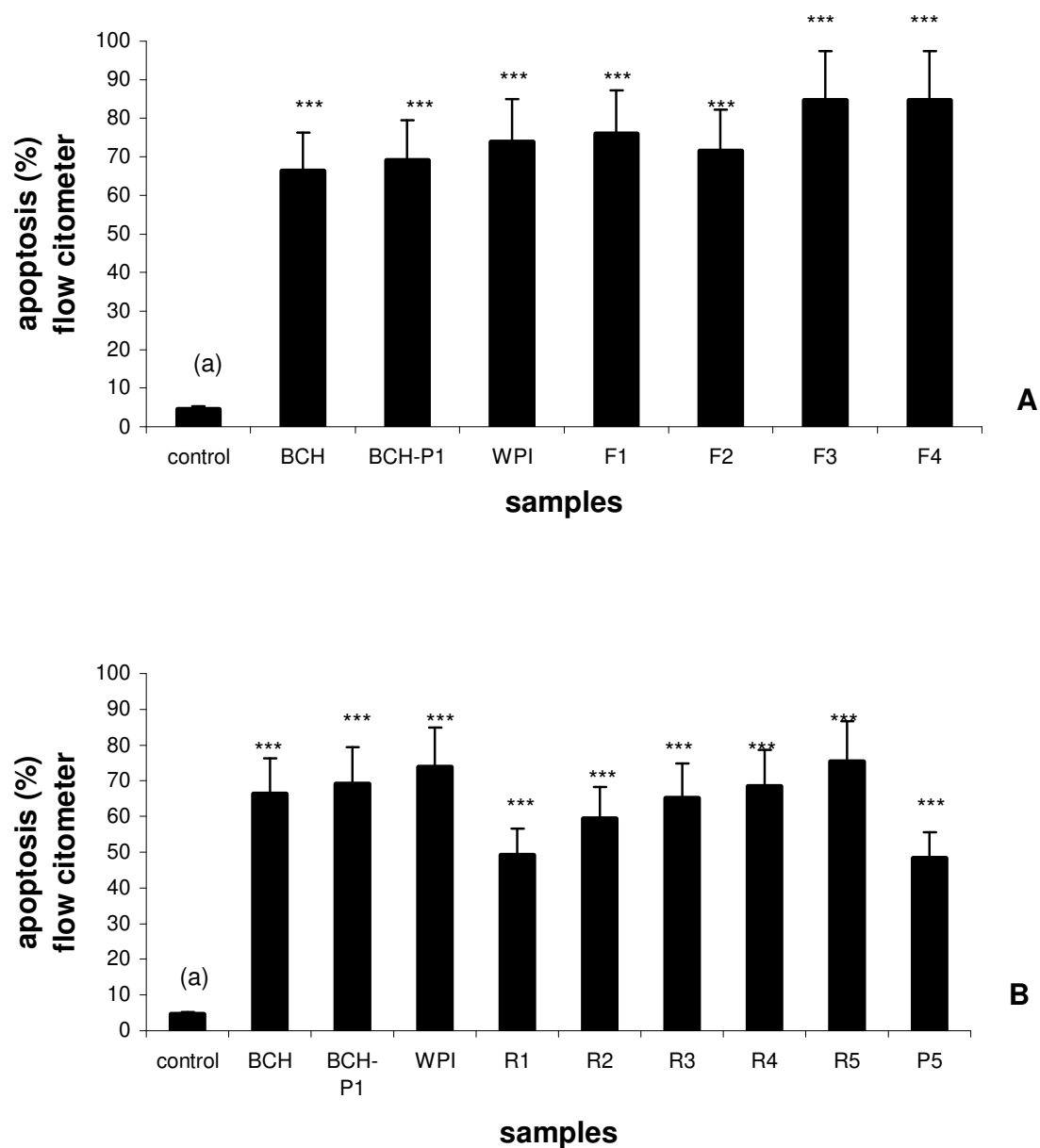
(a) control, B16F10 melanoma cell without test substance in the medium.

Figure 6. Cytotoxicity of bovine collagen derivatives and WPI at 400 μ g/mL measured in flow cytometer.



Tukey's test at 95% confidence intervals; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in relation to (a). (a) control, B16F10 melanoma cell without test substance in the medium.

Figure 7. Apoptosis % of bovine collagen derivatives and WPI at 400 μ g/mL measured in flow cytometer.



Tukey's test at 95% confidence intervals; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in relation to (a). (a) control, B16F10 melanoma cell without test substance in the medium.

In Vivo Anti-Tumoral Activity of Different Dietary Proteins on Melanoma B16F10 in the Presence or Absence of a Chemotherapeutic Treatment.

Geórgia A. Castro,¹ Durvanei A. Maria,² Consuelo J. Rodrigues,³ Valdemiro C. Sgarbieri,¹

¹State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Biochemistry and Biophysics Laboratory, Butantan Instituto, São Paulo, SP, Brazil.

³Human Topographic Anatomy Laboratory, Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP, Brazil.

Anti-tumoral Activity of Dietary Proteins

Key words: B16F10 melanoma, dietary protein, chemotherapy, *in vivo*, tumorigenesis

ABSTRACT. Whey protein isolate (WPI), a bovine collagen hydrolysate (BCH, ~10%DH) and a bovine collagen hydrolysate fraction P₁ (BCH-P1, mean MM 2.5 KDa) were used as dietary proteins (12g protein/100g diet) in American Institute of Nutrition (AIN-93) balanced rodent diets were fed, both in the absence or in the presence of Paclitaxel, a chemotherapeutic drug, to C57BL/6J mice bearing B16F10 melanoma. The animals were submitted to euthanasia by cervical dislocation 30 days after tumor cells transplantation. Main evaluated events were: percentage mortality, survival rate, body weight and caquexia, tumor volume and other macroscopic observations. Percentage mortality varied from 46.7% for the diet containing BCH-P1 to 77% for the combination diet of BCH-P1 and WPI (50:50%) on protein basis, compared with 20% mortality for WPI diet. For the treatment added chemotherapeutic drug, mortality ranged from 40% for the BCH / WPI (50:50) plus chemotherapeutic to 100% for the BCH treatment plus chemotherapeutic, compared with 50% mortality for the WPI diet plus chemoterapic. Comparing all treatments, the best one was WPI alone (20%) mortality followed by WPI / BCH (50:50) added chemotherapeutic drug (40% mortality). Survival rate as a function of time diminished in all dietary treatments in the presence of the chemotherapeutic drug. Tumor volume was largest for WPI treatment both in the absence and presence of the chemotherapeutic drug. Tumor burden, compared to WPI treatment, decreased from 35% to 88% for the various treatment in the absence, and from 47% to 91% in the presence of the chemotherapeutic drug. Therefore the group treatment BCH + WPI showed the best alternative to be used as complement to diet therapy of melanoma considering percentage mortality, survival rate and tumor volume.

INTRODUCTION

Diet can be considered as a risk factor in disease development, including cancer (1, 2). Restriction of some essential amino acids in the diets reduced tumor growth more than the quantity of diet provided (3, 4). Glutamine acts promoting cellular growth and reproduction in normal and tumoral tissues (5), also function as an immediate precursor in the intracellular synthesis of glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine).

Whey proteins have been researched extensively in the prevention and treatment of cancer (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Whey proteins such as serum albumin, α -lactalbumin and lactoferrin are rich source of sulfur amino acids, mainly cysteine which is believed to be absorbed in the sequence glutamyl-cystine promoting: (a) increase in glutathione concentration in relevant tissues, (b) stimulate immune function, and (c) detoxify potential carcinogens (9). Many animal studies have examined the effects of whey protein concentrate and some of its components including lactoferrin and β -lactoglobulin in its immune enhancing activity and colon cancer inhibition (7, 9, 12, 13, 14). Tsai et al. (14) demonstrated that a specific whey protein isolate (Immunocal) developed and patented in Canada enhanced the cytotoxicity effect of anticancer drugs.

Regarding collagen derivatives, besides technological/ functional properties, some physiological properties have recently been studied (15, 16, 17, 18). Ito et al. (19) demonstrated *in vitro*, that porcine skin gelatine presented anti-tumoral effect on MH134 murine hepatoma cells, inhibiting the neoplastic cells growth by

apoptosis. It was suggested that porcine skin (PS) gelatine induces apoptosis in MH134 cells evaluated through flow cytometric analysis. Agarose gel electrophoresis and electron microscopy findings revealed characteristic features in the case of apoptosis by PS gelatine. On the other hand, bovine bone (BB) gelatine did not induce apoptosis or necrosis (19).

Collagen is a fairly inexpensive protein although deficient in all essential amino acids and lacks tryptophan completely. Nevertheless, its peculiar amino acid composition and important physiological properties makes it a conditionally indispensable dietary protein (20). On the other hand, whey protein is expensive and difficult to obtain from milk but presents a balanced amino acid profile and high nutritive value. Therefore, the two proteins are likely to be complementary from both nutritional and physiological point of view.

In this investigation, the anti-tumoral effect of whey protein isolate (WPI) and collagen derivatives (hydrolysate fractions), alone or in combinations and in the presence or absence of chemotherapeutic (ChTP) drug were comparatively studied on C57BL/6J mice bearing B16F10 melanoma cells, with respect to macroscopic observations, survival rate, metastasis, cachexia, measurements of tumor growth and volume, and histological assessment.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Collagen derivatives (hydrolysates obtained from bovine skin raw material) was supplied by Gelita Group (Gelita South America), Cotia, São Paulo, Brazil. The whey protein isolate (WPI) from bovine milk was produced in pilot plant

scale using ultrafiltration technology (21). Anti-tumoral effect was investigated using melanoma cells (B16F10) provided by Ludwig-Swiss Institute, Switzerland. The mouse used in the experiments (C57BL/6J) were provided by the Laboratory of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute, São Paulo, Brazil.

Biological trials. Groups of six to seven female and six to seven male C57BL/6J mice around 30 days from birth were housed in a controlled temperature and humidity environment with 12 hours light and 12 hours dark cycles. Modified AIN-93 diets (22) were offered 4 weeks before B16F10 melanoma tumor cells transplantation. AIN-93 modification consisted in the use of 12% (12 g protein/100 g diet) of the various protein sources, instead of 17% protein as in the standardized diet for rodents. For collagen protein source, both bovine and porcine, the amino acids were added to the same level as the reference from FAO/ WHO. The diets were maintained isocaloric and isoproteic by compensating the 5% decrease in protein by equivalent amount of carbohydrate. The remaining nutrient composition of the AIN standard diet was maintained.

The sources of protein in the various diets were: whey protein isolate (WPI); bovine collagen hydrolysate (BCH, mean MM 3 KDa); bovine collagen hydrolysate fraction P1 (BCH-P1, mean MM 2.5 KDa); mixture 50:50% bovine collagen hydrolysate and WPI (BCH + WPI), and a mixture of 50:50% bovine collagen hydrolysate fraction P1 (BCH-P1 + WPI).

The diets were administered with and without the chemotherapeutic drug Paclitaxel (Taxol) 0.3 mg/animal (15 mg/kg body weight) once a week during 3 weeks (23, 24). The chemotherapeutic drug was injected in the tumor bearing mice

10 days after tumor cells transplantation by subcutaneous injection (5×10^5 B16F10 per mL) melanoma cells at the dorsal region (25, 26).

The animals were allowed to the diet and tap water “ad libitum” for the duration of the experiment. Thirty days after tumor cells transplantation the animals were sacrificed by cervical dislocation for macroscopic and microscopic tumors evaluation.

Macroscopic observations. Tumors observations were followed for 30 days after cells transplantation or until death start occurring in order to verify the rate of survival. Body weight changes were followed up by weighing the mice once a week using balance for animal assays. After 60 days of dietary treatment and 30 days of tumour cells transplantation, the animals were submitted to euthanasia by cervical dislocation and the following observations or measurements were performed: necropsy for analysis of dorsal tumours, macroscopic identification of internal nodules lesions, measurement of the mice tumors and weight and also photo documentation (25, 26, 27). Efficacy was calculated as the ratio of tumor size in the treated animals to the tumor size in control animals (WPI group).

Measurements of primary dorsal tumour growth. For both assays, without and with chemotherapeutic, the animals were followed by measuring tumor growth on alternative days, starting 10 days after tumoral transplantation. Tumor volume was calculated using the following formula: tumor volume = (length) $\times$ (width)² $\times$ ($\pi/3/4$). The sacrificed animals were also submitted to the necropsy and the tumor nodules present in the internal tissues were counted and measured (27). Metastasis were

also evaluated, as the number, volume and size of the tumors. This assessment was done in different organs which presented metastasis (28).

Statistical analysis. Weekly body weight, changes in tumour volume, and all measurements which were performed were compared by one-way analysis of variance. Differences were expressed by $p < 0.05$. Differences in number and size of tumors were tested for statistical significance, using analysis of variance and differences among means by Duncan's or Tukey's test at $p < 0.05$. The percentage of mortality was analyzed by contingency analysis using Fisher's test. All the experimental data were expressed as the mean $\pm$ sdm.

RESULTS AND DISCUSSION

Percentage of mortality. Percentage mortality was determined for all study groups both in absence and in the presence of the chemotherapeutic treatment. The results are shown in Table 1. The protein diet groups without chemotherapeutic treatment was compared with whey protein isolate (WPI) also without drug treatment and the protein diet groups treated with chemotherapeutic drug were compared to WPI treated also with the same drug. Comparisons were also made in the same protein diet group treated or non treated with the chemotherapeutic drug.

All groups without chemotherapy treatment presented higher mortality than WPI diet group (20%; $p < 0.001$). The group BCH-P1 + WPI showed increase of percentage mortality (56.9%, $p < 0.001$) compared to WPI group. On the other hand,

the diet group BCH-P1 presented the lowest percentage mortality increase (26.7%, $p<0.001$). Similar results were obtained by Tsai et al. (14) in a study conducted with anti-cancer drugs and whey protein increasing the cytotoxicity effect of chemotherapies. Some authors suggested that this effect is caused by reduction of glutathione in tumor cells (9).

Comparing the diet groups treated with chemotherapeutic drug to WPI + ChTP group, except for the diet group BCH + WPI (ns), all other groups showed increased percentage of mortality ($p<0.001$) for BCH + ChTP and ($p<0.0059$) for BCH-P1 + WPI + ChTP, and for BCH-P1 + ChTP. Therefore, the lowest percentage mortality when considered all diet groups treated with chemotherapeutic drug was the WPI and the BCH + WPI ($p=0.2007$), with no statistical difference between them.

Considering the same protein diet group with and without chemotherapeutic treatment, the dietary protein groups which did not present mortality increase due to addition of the ChTP drug were BCH + WPI ($p=0.2007$), and BCH-P1 + WPI group ($p=0.377$). All other dietary groups showed higher percentage mortality when submitted to chemotherapeutic treatment.

It was observed that the combination BCH + WPI + ChTP showed lower mortality than WPI + ChTP ($p=0.2007$), suggesting a possible synergistic action of the two proteins when administered together. On the other hand, when WPI was used in combination with BCH-P1 + ChTP the percentage mortality increased ($p<0.001$) comparing with WPI + ChTP. Lower percentage mortality showed by the protein group BCH + WPI + ChTP could be attributed to the effect of whey protein

on tumorigenesis acting as reducing agent preventing oxidation and tissue damage through thiol (sulfhydryl) groups of cysteine present in these proteins (10). It was also demonstrated that Immunocal (whey protein enriched with lactoferrin) prevented cytotoxic effect. The humoral immune response of mice fed whey protein concentrate (WPC) was significantly higher compared than animals fed other nutritionally similar dietary protein. The incidence of tumors was also lower (13, 14).

Survival rate. The influence of all protein diets on the survival rate of mice bearing the melanoma tumors is illustrated in Figure 1 A and B, for the diets without chemotherapeutic treatment (Fig 1A) and with chemotherapeutic treatment (Fig 1B). In the Figure 1, the data which should be considered is the last point of the curve before the animals were sacrificed. As this point is higher, less probability the dietary protein and the treatment caused toxicity to the animals.

Considering all protein diet groups without chemotherapeutic treatment the BCH-P1 group presented the shortest survival time with animals starting to die at the 17th day while for WPI and BCH groups death started at the day 23th. For the other diet groups animal death started at day 25th after tumor transplant. The diet group which presented the highest percentage of survival (the percentage of animals alive in the last day of treatment before sacrifice) was WPI (80%) followed by BCH-P1 (53.3%) and BCH + WPI (50%). Therefore, it could be concluded that the combination of BCH and WPI did not increase the percentage survival. On the other hand, the combination of BCH-P1 with WPI showed decrease in percentage of survival which was 23.1% at the end of the treatment.

From the dietary protein groups treated with chemotherapeutic drug, BCH + WPI + ChTP showed the highest percentage of survival (60%). The first day of animal death for this group occurred at day 17 after transplant, the same day for BCH + ChTP and BCH-P1 + WPI + ChTP groups. For WPI + ChTP and BCH-P1 + ChTP groups, the first day of animal death was the day 13 after transplant. Comparing BCH + WPI + ChTP group with the WPI + ChTP, it could be observed that percentage of survival increased for the combination of the two proteins. However, when comparing the BCH + ChTP with the BCH + WPI + ChTP group, the percentage of survival increased from 0% to 60%, respectively, but the day of starting animal death was the same.

It could be suggested again that WPI acts as a synergic protein with bovine collagen hydrolysate (BCH) when in the presence of the chemotherapeutic treatment (ChTP), but the combination of BCH-P1 + ChTP did not show the same effect, presenting only 30% of survival, and the first day of animal death was the day 17 after transplant.

The treatment which showed the highest survival rate was bovine collagen hydrolysate (BCH) in combination with WPI and in the presence of the chemotherapeutic (60% survival rate), and showing survival time of 33 days after B16F10 transplant. Considering the protein diet groups in the absence of chemotherapeutic, WPI presented the highest survival rate (80% followed by BCH-P1 (53.3%) for the same survival time.

Comparison between BCH + WPI, without and with chemotherapeutic treatment, it was observed that the percentage survival increased from 50% to

60%, respectively, which was not found for all other dietary protein groups which showed a increase in percentage survival when chemotherapeutic treatment was applied.

Wu et al. (29) described that the synthesis of glutathione (GSH) from glutamate, cysteine and glycine is catalyzed sequentially by two cytosolic enzymes, γ -glutamylcysteine synthetase and GSH synthetase. Animal and human studies demonstrate that adequate protein nutrition is crucial for the maintenance of GSH homeostasis. Glutathione plays important roles in antioxidant defense, nutrient metabolism, and regulation of cellular events (including gene expression, DNA and protein synthesis, cell proliferation and apoptosis, signal transduction, cytokine production and immune response). Glutathione deficiency contributes to oxidative stress, which plays a key role in aging and the pathogenesis of many diseases (including HIV, cancer, heart attack, stroke and diabetes). Depletion of glutathione leads to increased sensitivity to irradiation and oxidative stress. The intra-cellular cysteine delivery system was used to promote glutathione synthesis, and this was found to protect against toxicity (30).

In the present study, high survival rate found for WPI could be understood by cysteine content present in this protein, promoting GSH synthesis which avoid oxidative stress.

Body weight and caquexia. Regarding body weight no significant change was observed as a function of time nor among the protein diet groups (Figure 2A and B). Caquexia was not observed for the WPI group, but it was observed in 10%

of the animals of the BCH group. In the group treated with the two proteins (BCH + WPI) caquexia was expressed in 10% of the animals. The group treated with BCH + WPI + ChTP no caquexia was observed. Therefore, when the mixture of these two proteins were applied in the presence of the chemotherapeutic drug the animals response was better.

Tumor volume. The rate of the tumor growth was established after the inoculation of B16F10 melanoma cells and considering the protein diet groups without and with chemotherapeutic treatment (ChTP) (Figure 3 A, B). Considering the diet groups without ChTP, the WPI group presented the largest tumor volume as well as the fastest rate of growth, and BCH + WPI group the smallest volume, showing 88.7% of tumor burden reduction compared with the WPI group ($p < 0.05$). The BCH-P1 group presented 54.5% tumor burden reduction compared with WPI group ($p < 0.05$) while the BCH group presented 42.8% tumor burden reduction ($p < 0.05$). On the other hand, the BCH-P1 in combination with WPI showed 35.1% of tumor burden reduction. These two bovine collagen proteins (BCH and BCH-P1) seem to have different behavior in relation to tumor growth, and the main difference between them is the molecular mass, BCH-P1 presents mean MM 2.5KDa, and BCH a mean MM of 3.0KDa.

From the protein diet groups treated with chemotherapeutic drug, the largest tumor volume was found for WPI + ChTP group ($p < 0.05$), and the smallest volume was found in BCH + WPI + ChTP group, a tumor burden reduction of 90.6% comparing with WPI + ChTP group ($p < 0.05$). The groups BCH-P1 + WPI + ChTP and BCH + ChTP presented 70.3% and 72.3% tumor burden reduction,

respectively, in relation to WPI + ChTP group ($p < 0.05$). The smallest tumor burden reduction was found for BCH-P1 + ChTP group (46.7%) compared with WPI + ChTP ($p < 0.05$).

The tumor volume found for collagen derivates were smaller than for WPI, and when these proteins were used in combination the volume was the smallest found. This effect of collagen derivates could be explained by the investigation reported by Roth et al (31) studying cultures of B16F10 melanoma cells, in the presence or absence of mAb HUIV26 (cryptic epitope of collagen protein) or an isotype-matched control antibody. The results showed that mAb HUIV26 inhibit the B16F10 adhesion dose dependently, suggesting that the effects of mAb HUIV26 on adhesion are not restricted to a single tumor cell type. The tumor cell interactions with denatured collagen type IV are dependent, in part, on cellular recognition of the HUIV26 cryptic epitope of collagen type IV (31). This study suggested that tumor cell interactions with the HUIV26 cryptic epitope play an important role in regulating experimental metastasis and this cryptic element may represent a therapeutic target for controlling the spread of tumor to distant sites.

Tumor growth, angiogenesis, metastasis and spleen evaluation. From the Figure 4 A, B, C and D one could notice the differences concerned tumor growth, vascularization, tumor size and observations surrounding the animal tumor.

The majority of the animals treated with WPI protein without chemotherapeutic treatment did not die during the treatment and presented dorsal tumor pigmented, ulcerated but without apparent necrosis, only some of them with internal necrosis (Figure 4B). The metastasis was not observed (Figure 5), but the

tumor showed significant vascularization in its surrounding (Figure 4B). This positive response regarding metastasis for WPI dietary group was also shown by Waard et al (32). The incidence and multiplicity of colon cancer were reduced in rodents by using lactoferrin treatment. The diet with 0.02-2% lactoferrin inhibited the tumor formation (32).

The spleen area calculated for WPI group ($1.07\text{cm}^2 \pm 0.33$) was similar to BCH spleen area ($0.81\text{cm}^2 \pm 0.19$) and the group BCH + WPI, without chemotherapeutic treatment ($p>0.05$). The majority of the animals treated with BCH without the chemotherapeutic drug showed tumor pigmented ulcerated and necrotic with almost 67% of them with metastasis in lymphonodes (Figure 4A and Figure 5). The vascularization surrounding the tumor was discrete when BCH and WPI were used in combination. The pronounced necrosis observed in collagen derivates dietary groups could be explained by interactions of tumor cells, with extracellular matrix components which are also contributing to the regulation of proliferation (31). The B16F10 seems to interact with collagen from extracellular matrix promoting the necrosis.

The spleen area of WPI animals was similar to BCH when treated with chemotherapeutic and also similar to the group fed BCH + WPI + ChTP; $p>0.05$. The group treated with both proteins without chemotherapeutic presented tumor pigmented, ulcerative and necrotic with metastasis in lymphonodes in 20% of the animals (Figure 5) and vascularization was absent surrounding the tumor (Figure 4C). The group treated with BCH + WPI with ChTP showed tumor pigmented, ulcerative and necrotic without vascularization surrounding the tumor (Figure 4D).

This protein group had almost 17% of the animals with metastasis in lymphonode (Figure 5).

The spleen area for BCH + WPI group was ($0.94\text{cm}^2 \pm 0.25$) similar to WPI group and the BCH + WPI + ChTP also similar to WPI + ChTP group ($p > 0.05$). It could be verified that the animal treated only with WPI as protein source showed intense vascularization (Figure 4B), tumor growth was large, high tumor volume and growth rate, with a few areas of necrosis. On the other hand, the animal group fed only BCH presented small tumor size (Figure 4A), presenting ulcerated and large areas of necrosis but with low vascularization. When WPI and BCH were used together, the tumor size was not so small, but the vascularization reduced (Figure 4C). The diet using BCH and WPI showed reduction of tumor size and growth and no apparent vascularization. Probably, the WPI and the collagen hydrolysates act differently in tumorigenesis, WPI stimulating immune system and bovine collagen derivatives blocking vascularization, blood supply to the tumor, suggesting that collagen derivatives could act as anti-angiogenic agent.

Regard to metastasis, there were four groups which did not present metastasis, BCH-P1 and BCH-P1 + WPI without and with ChTP. For WPI, when ChTP was applied the metastasis was detected in lymphonodes and lung for 40% of animals. On the other hand, for BCH and BCH + WPI groups when ChTP was used the metastasis decreased from 67% to 40% and from 20% to 17%, respectively. The metastasis was detected in lymphonodes, lung and liver.

The improvement observed with WPI treatment was probably caused by the effect of this protein in anti-tumoral activities modulated immunologically. This

same effect was already observed through the glutamine infusion during bone medulla transplantation (5) which could preserve the hepatic function through maintenance of glutathione concentration that protects the hepatocytes against oxidative stress caused by chemotherapeutic treatment. The cellular growth is a function of glutamine influx, suggesting that this molecule is used to synthesize glutathione (5). The whey proteins contain relatively high concentration of methionine, which stimulates the cell turnover proliferation from crypt cells (33).

The anti-angiogenic effect of collagen derivatives was already observed by a study conducted by Teodoro et al (34) showing that p53 transcriptionally activates the $\alpha(II)$ collagen prolyl-4-hydroxylase [$\alpha(II)$ PH] gene, resulting in extracellular release of antiangiogenic fragments of collagen type IV and type XVIII.

The triple helical conformation of the collagenous domain plays a critical role in some interactions to promote melanoma cells adhesion, migration and invasion. It was also demonstrated (35) that a sequence from the collagen $\alpha3(IV)$ NC1 domain inhibits melanoma cell proliferation, migration and invasion by decreasing metalloproteinases (MMP) production and activation. Peptide sequences from the $\alpha1(IV)$, $\alpha2(IV)$, and $\alpha3(IV)$ chains, were shown to inhibit angiogenesis (35).

Therefore, the diet group which presented the best alternative to be used as auxiliary diet during chemotherapeutic treatment was BCH + WPI considering percentage mortality, survival rate and tumor volume. The bovine collagen protein seemed to present different mechanism for inhibition of tumorigenesis than whey

protein isolate, and both used together could retard the tumoral progression more effectively.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the financial support given by Gelita South America, Cotia, SP, and Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil for providing the technical support.

REFERENCES

1. Rowlands, J.C., Hakkak, R., Ronis, M.J.J., Badger, T.M. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary and CYP1 expression in female rats. *Journal of Nutrition*. 2001; 131(12):3281-3287.
2. Bennink, M.R. Soybean in the prevention and treatment of cancer. *Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana*, Londrina; 2001. p.24-27.
3. Pine, MJ. Effect of low phenylalanine diet on murine leukemia L 1213. *Journal of National Cancer Institute*. 1978; 60 (3):633-641.
4. Theuer, R. Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implanted BW 1032 adenocarcinomas. *Journal of Nutrition*. 1971; 101(2):232-233.
5. Collins CL, Wasa M, Souba WW, et al. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumour-derived breast cell lines. *Journal Cell Physiol*. 1998; 176(1):166-78.
6. McIntosh, GH., Royle, PJ., Le Leu, RK., Regester, GO., Johnson, MA., Grinsted, RL., Kenward, RS., Smithers, GW. Whey proteins as functional food ingredients? *Int. Dairy Journal*. 1998; 8: 425-434.
7. Bounous, G., Batist, G., Gold, P. Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Letters*. 1991; 57: 91-94.
8. Sgarbieri, VC. The role of dietary energy and macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (an overview). *Ciência e Cultura*. 1999; 51: 104-121.

9. Bounous, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.*2000;20: 4785-4792.
10. Marshall, K. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine review.*2004; 9: 136-156.
11. Sgarbieri, VC. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista Nutrição.*2004; 17: 397-409.
12. Dias, NFGP., Sgarbieri, VC., Jacobucci, HB. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in the mouse. *Lait.* 2006; 86: 213-226.
13. Kuhara, T., Iigo, M., Itoh, T. et al. Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr. Cancer.*2000; 38: 192-199.
14. Tsai, WY., Chang, WH., Chen, CH., Lu, FJ. Enhancing effect of patented protein isolate (Immunocal) on the cytotoxicity of anticancer drug. *Nutr. Cancer.*2000; 38: 200-208.
15. Krans, C; Schwars, E. Osteoporose-artrose : aspectos nutricionais e fisiológicos em relação à prevenção e ao acompanhamento terapêutico. Proveta Food AG, Hoechst, Alemanha, 60 p. 2001.
16. Brodie, JM. Hair growth benefits from dietary cystine-gelatine supplementation. *Journal Applied Cosmetology.*1984; 2: 15-27.
17. Morganti, P. The effect of gelatin-glycine on skin hydration. *Journal of Applied Cosmetology.*1990; 8: 81-88.

18. Oesser, S; Adam, M; Babel, W; Seifert, J. Oral administration of ^{14}C -labelled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *Journal of Nutrition*.1999; 129: 1891-1895.
19. Ito, N; Kojima, T; Nagath, H; Ozeki, N; Yoshida, Y; Nonami, T. Apoptosis induced by cultuing MH134 cells in the presence of porcine skin gelatin in vitro. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceutical*.2002; 17(4): 379-384.
20. Ward, AC; Courts, A. The science and technology of gelatin. Academic Press, New York, 1977.
21. Maubois, JL., Olivier, G. Extraction of milk protein. In: *Food Proteins and their Applications*. Marcel Dekker Inc. 1997, NY, CH: 579-595.
22. Reeves, P.G; Nilsen, F.H; Fahey, J.R. AIN-93 purified diet for laboratory rodents: Final report of the American institute of Nutrition ad hoc Writing Commitee on the Reformulation of AIN-76 Rodent Diet. *Journal of Nutrition*. 1993; 123: 1939-1951.
23. Zhang, X.; Burt, H.M.; Mangold, G; Dexter, D.; Hoff, D.V.; Mayer, L; Hunter, W. Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti Cancer Drugs*.1997; 8:696-701.
24. Rodrigues, D.G; Maria, D.A; Fernandes, D.C; Valduga, C.J; Couto, R.D; Ibanez, O.C; Maranhão,R.C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005; 55(6):565-76.

25. Geran, R.I. Greenberg, N.H. Macdonald, M.M. Schumacher, A.M. Abott, B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. 3ed., Betheseda, Maryland, 47-51; 1972.
26. Brentani M.M. Bases da Oncologia. 2ª ed. São Paulo: Lemar Livraria; Editora Marina e Tecmed Editora, 2003.
27. Henry, R.J. Clinical Chemistry Principles and Techniques. 2nd. Ed. Hargeston: Harper & How, 1974.
28. Junqueira, L.C.U.; Junqueira, M.M.S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Editora Santos. 1983.
29. Wu, G; Fang, Y.Z; Yang, S; Lupton, J.R; Turner, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. J. Nutr. 2004; 134:489-492.
30. Williamson, J.M; Boettcher, B; Meister, A. Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1982; 79:6246-6249.
31. Roth, JM., Caunt M., Cretu A., Akalu A., Policarpio D., Li X., Gagne P., Formenti S., Brooks P.C. Inhibition of experimental metastasis by targeting the HUIV26 cryptic epitope in collagen. Am. Journal Pathology. 2006; 168(5):1576-1586.
32. Waard RD, Belzen NV, The anti-carcinogenic potential of lactoferrin. AgroFood Industry Hi-Tech; March-April; 2003.
33. Duranton B, Freund JN, Galluser M, et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by dietary methionine. Carcinogenesis 1999, 20(3): 493-7. In: Waitzberg DL. Dieta, Nutrição e Câncer. 1a. ed. Atheneu; 2204. p. 182-183.

34. Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, Green MR. p53-Mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science*. 2006, 313 (Aug): 968-971.
35. Pasco S, Brassart B, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. *Cancer Detection and Prevention*. 2005, 29: 260-66.

Table 1. Evaluation of percentage mortality in all dietary groups

Treatment	Number of Animals	Mortality (%)	Difference in mortality		
			(a)	(b)	(c)
WPI ^(a)	15	20			
WPI + ChTP ^(b)	10	50			30***
BCH	10	70	50***		
BCH + ChTP	10	100		50***	30***
BCH-P1	15	46.7	26.7***		
BCH-P1 + ChTP	10	70		20**	23.3**
BCH + WPI	10	50	30***		
BCH +WPI+ChTP	10	40		-10 ^{ns}	-10 ^{ns}
BCH-P1 + WPI	13	76.9	56.9***		
BCH-P1 +WPI + ChTP	12	83.3		33.3***	6.4 ^{ns}

Contingency analysis – Fisher's test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ^{ns}= non significant. ^(a) Compared WPI with other treatments without ChTP; ^(b) Compared WPI + ChTP with other treatments; ^(c) Comparison between the same protein treatment without and with ChTP.

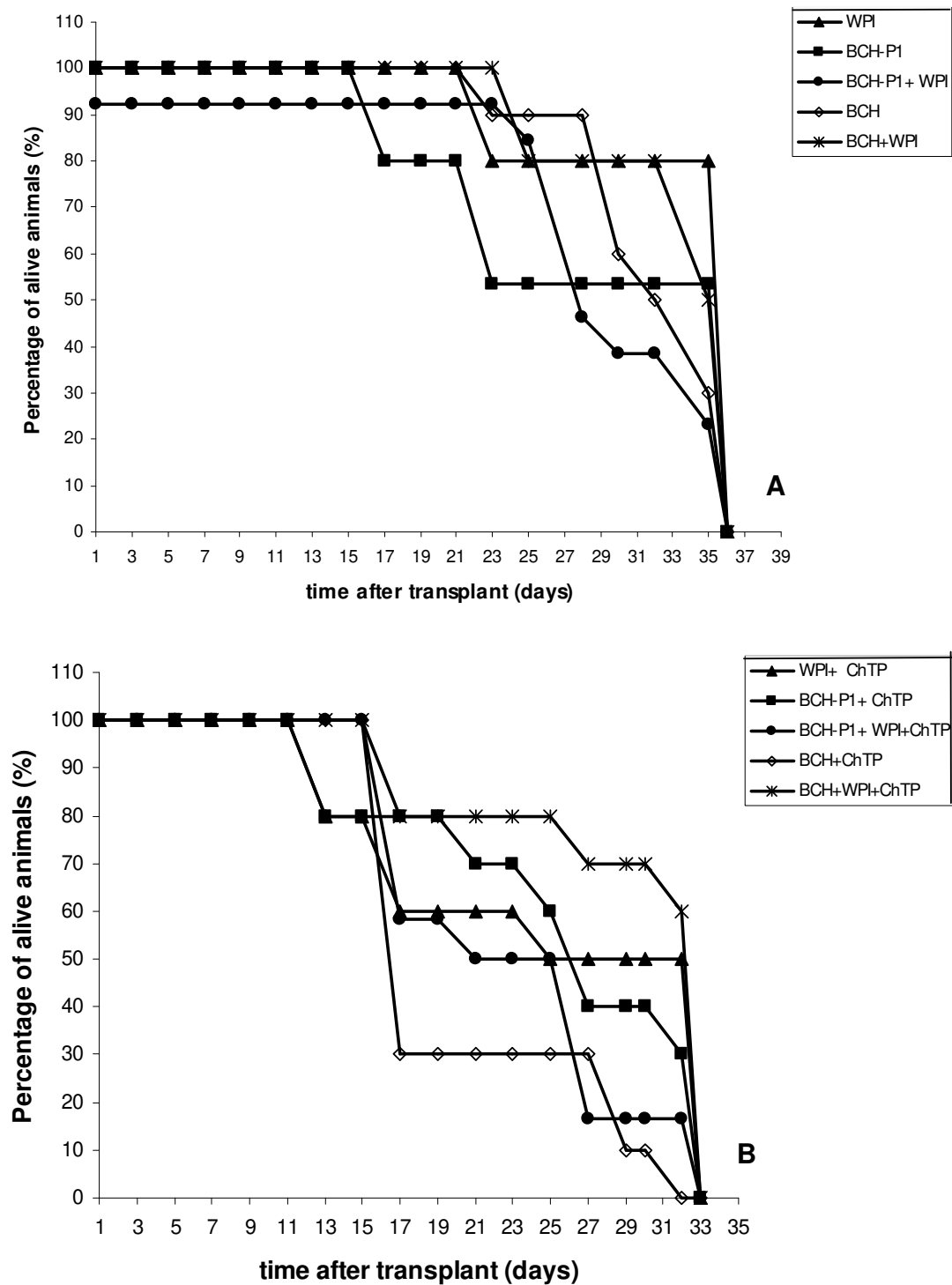


Figure 1 A and B. Survival rate of all diet groups non treated (A) and treated (B) with 15 mg/ Kg weight of the Paclitaxel chemotherapeutic treatment.

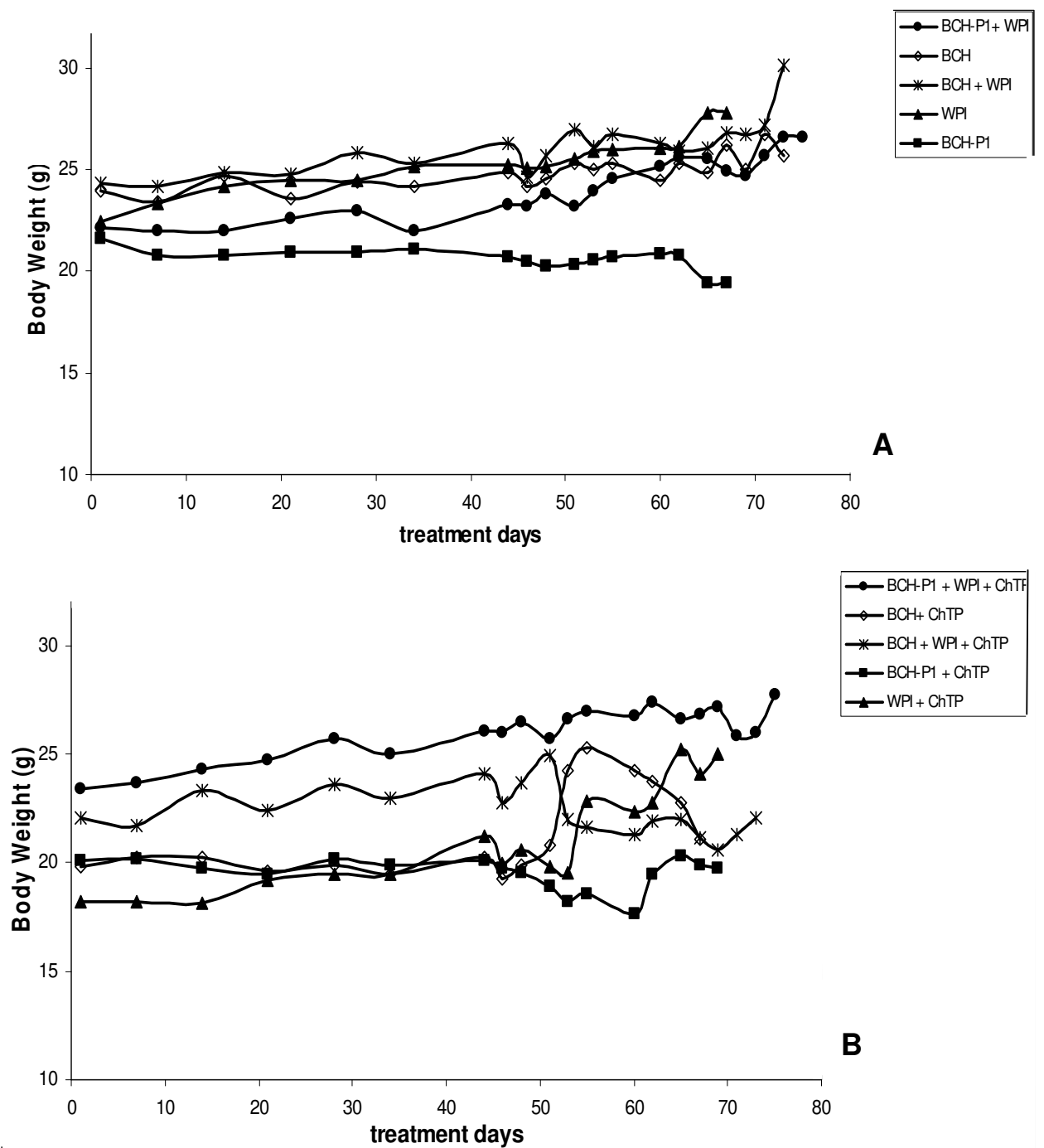


Figure 2 A and B. Body weight for all diet groups non treated (A) and treated (B) with 15 mg/Kg body weight of the chemotherapeutic drug Paclitaxel.

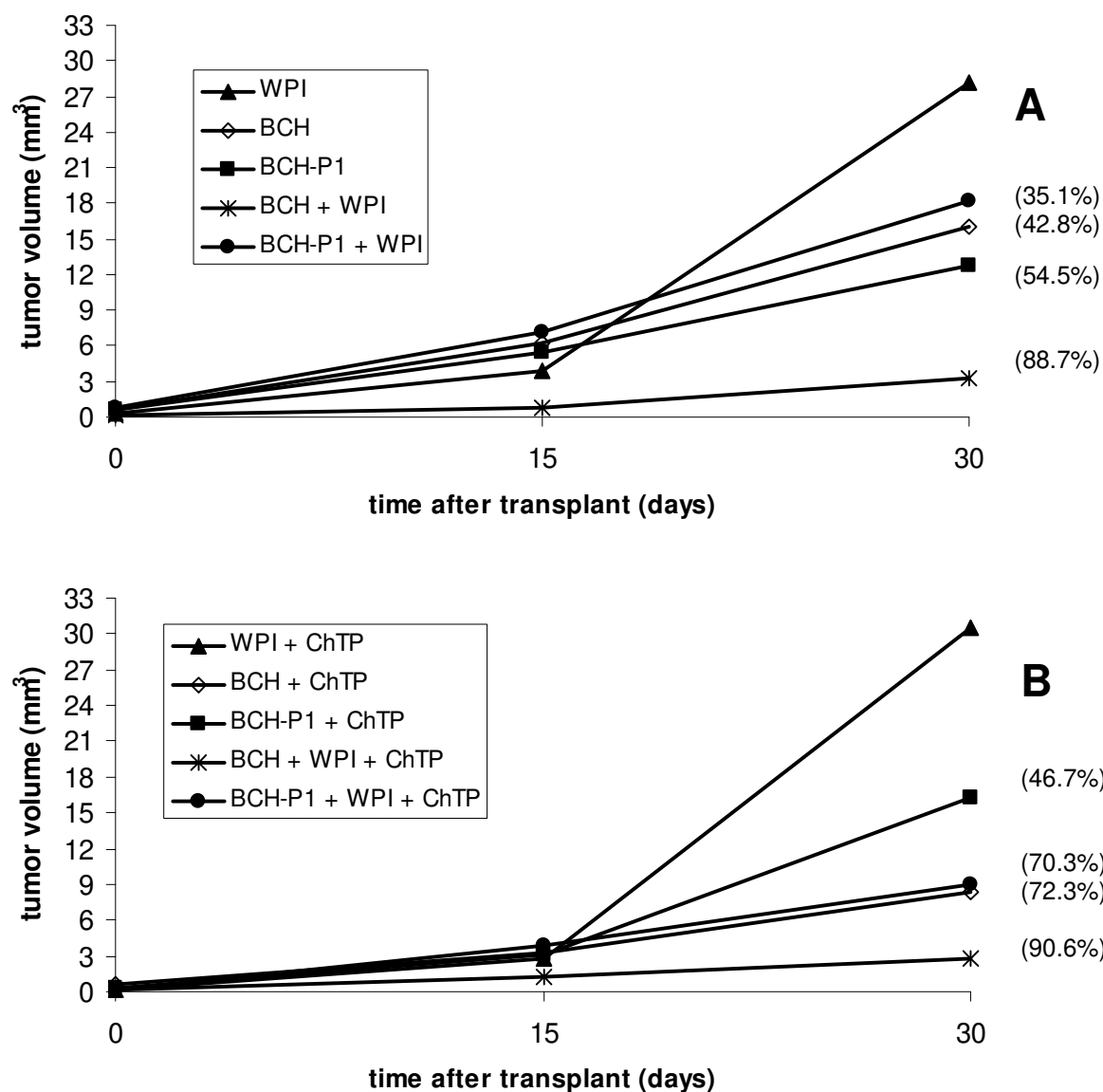


Figure 3 A and B. Tumor volume for all protein diet groups Tumor burden reduction expressed in percentage (parenthesis), always in comparison to WPI group (100%), either in the absence (A) or presence (B) of the chemotherapeutic treatment.



Figure 4 A, B, C and D. Macroscopic aspect of mice bearing tumor melanoma B16F10.

Pictures taken in the end of experiment A. BCH treatment without chemoterapic drug. B. WPI treatment without chemotarapic drug. C. BCH + WPI treatment without chemoterapic drug. D. BCH + WPI treatment with chemotherapic drug.

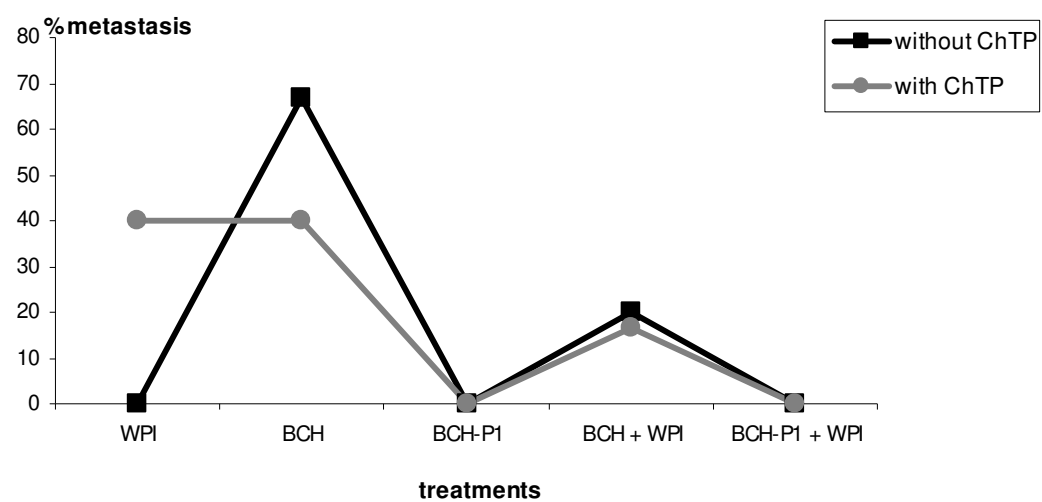


Figure 5. Metastasis percentage for all diet groups without and with chemotherapeutic treatment (Paclitaxel 15 mg/Kg body weight).

Analysis of cell cycle phases and proliferative capacity in mice bearing melanoma, maintained on different dietary proteins

Castro GA¹, Maria DA², Rodrigues CJ³, Sgarbieri VC¹.

¹State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Biochemistry and Biophysics Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil.

³Human Topographic Anatomy Laboratory, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Background: The proliferate states can be unified in a single cell cycle model that recognizes differences in the behavior of rapidly dividing and slowly dividing cells in the same population. It has been suggested that the number of nucleolar organizer regions (NORs) may reflect nuclear and cellular activity. In this study the influence of dietary protein in the growth of melanoma B16F10 was evaluated through analyses of tumor cell population in cell cycle phases and number of NORs.

Methods: Cell cycle phases and proliferative activity were determined through staining with silver applying AgNORs technique in mice bearing B16F10 melanoma cells, fed different dietary proteins. All data were submitted to statistical analyses.

Results: The G0/G1 phase increased for the animals group fed BCH or BCH-P1 + WPI compared with the mice that received only WPI in the diet. The same trend was found for these dietary group treated with chemotherapeutic. The mice that received BCH + WPI treated with chemotherapeutic showed the highest percentage of

apoptosis compared with WPI diet group. Analysing AgNORs, the total NORs/ cells and dot number /cell for all dietary protein groups were higher than for WPI in absence of chemotherapeutic treatment. On the other hand, when chemotherapeutic was applied the only two dietary protein groups which presented higher total NORs and dot per cell were BCH + WPI and BCH-P1 + WPI. All data were statistically evaluated.

Conclusions: Lower significant proliferative capacity and larger number of cells at G0/G1 phase were observed for the dietary protein groups combining the two proteins, BCH or BCH-P1 with WPI, and application of Paclitaxel chemotherapeutic treatment.

Key words: melanoma, AgNOR, cell cycle phases, dietary protein.

It was stated ¹ that acquired/inherent genetic instability in normal cells causes mutational events that result in neoplastic transformation and provide such cells with a selective growth advantage over adjacent normal cells. Proliferation of neoplastic cells then proceeds, either immediately or after a considerable latent period.

Some cell cycle models assume that cells are normally in a quiescent state until they are stimulated to enter the cell cycle and proceed through an S phase of fixed duration. Other models assume that cells cycle progresses rapidly until they undergo growth retardation, proceed through the S phase of longer duration, and then undergo apoptosis or preferentially cell differentiation. The proliferative states can be unified in a single cell cycle model that recognizes differences in the behavior of rapidly dividing and slowly dividing cells in the same population. The mitogenic signaling pathway is divided into a proximal segment, which consists of growth factor-induced membrane signaling, commonly through the genes *ras*, *raf*, and cyclin D/cdk retinoblastoma (Rb) kinase activation, and is subject to controls and balances that are designed to limit the propagation of the mitogenic signal. The distal segment of the mitogenic signaling pathway, which consists of retinoblastoma (Rb) phosphorylation, the release of transcription factor (E2F), the induction of *c-myc*, cyclins E and A, and DNA synthesis, is distinguished by a multiplicity of nested positive feedback loops; these would be expected to drive a mitogenic signal that entered the distal segment through at least one round of DNA synthesis. ²

Studies about genetic instability showed that silver staining indicates the presence of nucleolar organizer region (AgNOR) in the short arm of chromosome allowing to evaluate the genetic instability through a single chromosome level.¹ Nucleolar organizer regions (NORs) are loops of DNA that are present in the nuclei of cells, and which possesses ribosomal RNA genes. NORs are readily stained in metaphase chromosome spreads by argyrophil technique. It has been suggested that the number of NORs may reflect nuclear and cellular activity. The number of AgNOR and subjective AgNORs pattern assessment (SAPA) score represents proliferating cellular activity, and therefore, can be used for detecting malignancy.³ The area occupied by the silver-stained interphase NORs within the nucleolus is related to the total nucleolar area and to the level of ribosome biogenesis. Therefore, the evaluation by image analysis of the area occupied by the silver-stained interphase NORs within the nucleoli allows to obtain precise information on the nucleolar size. ⁴ More recently, it has been suggested that the numbers of AgNORs in nuclei may reflect their state of activation or, indeed, malignancy.⁵

In cancer cells, this arrangement is often disrupted, with increased number of NORs of abnormal shapes and different sizes, including small dots. Some studies have used NOR patterns as prognostic tools to evaluate proliferation levels ⁶, troublesome borderline lesions ⁷, and tumor progression. Increased staining and alterations in shape, size, and number of NORs account for extra amounts of ribosomes needed by highly proliferating cancer cells. Changes in copy number and transcription of ribosomal cistrons have been reported showing altered NOR patterns on skin cancers. ^{7, 8, 9}

Malignant melanoma cells presented scattered NORs (dots) and increased number of clusters. Statistical differences were found concerning the number of NORs between pre-malignant lesions and malignant melanoma, but not between benign and dysplastic nevus.^{10, 11} Furthermore, increased number of NOR clusters and dots were observed in melanoma more than 1.5-mm width, correlated to a worse prognosis.¹² Patients bearing melanoma tumor stage I, with a high number of NORs, developed metastasis some months earlier than those with fewer NORs.¹³ Nevertheless, there are discrepancies among different studies regarding the prognostic value of AgNOR counts in melanoma.¹⁴

There is evidence that in proliferating cells the quantity of interphase AgNORs, both nucleolin and nucleophosmin, progressively increases from early G1 phase, reaches a maximum value at the end of S-phase and remains constant up to the late G2 phase.^{4, 15} AgNOR values have been shown to be linearly related to the rapidity of the expansion of the tumor mass in patients with lung and liver cancers. Since the tumor mass growth rate is one of the most important factors influencing the clinical outcome, it follows that the AgNOR value represents a valuable parameter to have information about the progression of tumor disease in the host. A significant correlation between AgNOR value and patient survival have been reported in many types of cancer disease, demonstrating that the AgNOR quantity was the only significant parameter predicting patient death.⁴ It has long been known by pathologists that hypertrophy of the nucleolus is one of the most distinctive cytological features of cancer cells.¹⁵

The objective of this study was to evaluate the influence of dietary protein in the growth of melanoma B16F10 through analyses of tumor cell population in cell cycle phases and number of nucleolar organizer regions (NORs).

Materials and methods

Materials. The cells used in this investigation were collected from B16F10 melanoma tumor cells already implantated in mice C57BL/6J after a treatment period. These animals were treated with different protein diets that were isocaloric and isoproteic: BCH (bovine collagen hydrolysate), BCH-P1 (bovine collagen hydrolysate fraction, mean MM 2.5kDa), whey protein isolate (WPI) and mixtures of WPI and BCH or BCH-P1 fraction. The diets were fed to the rats with or without chemotherapeutic drug. The chemotherapeutic used was Paclitaxel (Taxol) 0.3mg per animal (15mg per Kg body weight) one time a week during three weeks.¹⁶

Animal assay- experimental protocol. A summarized fluxogram of the experimental protocol^{16,17} is represented in Figure 1.

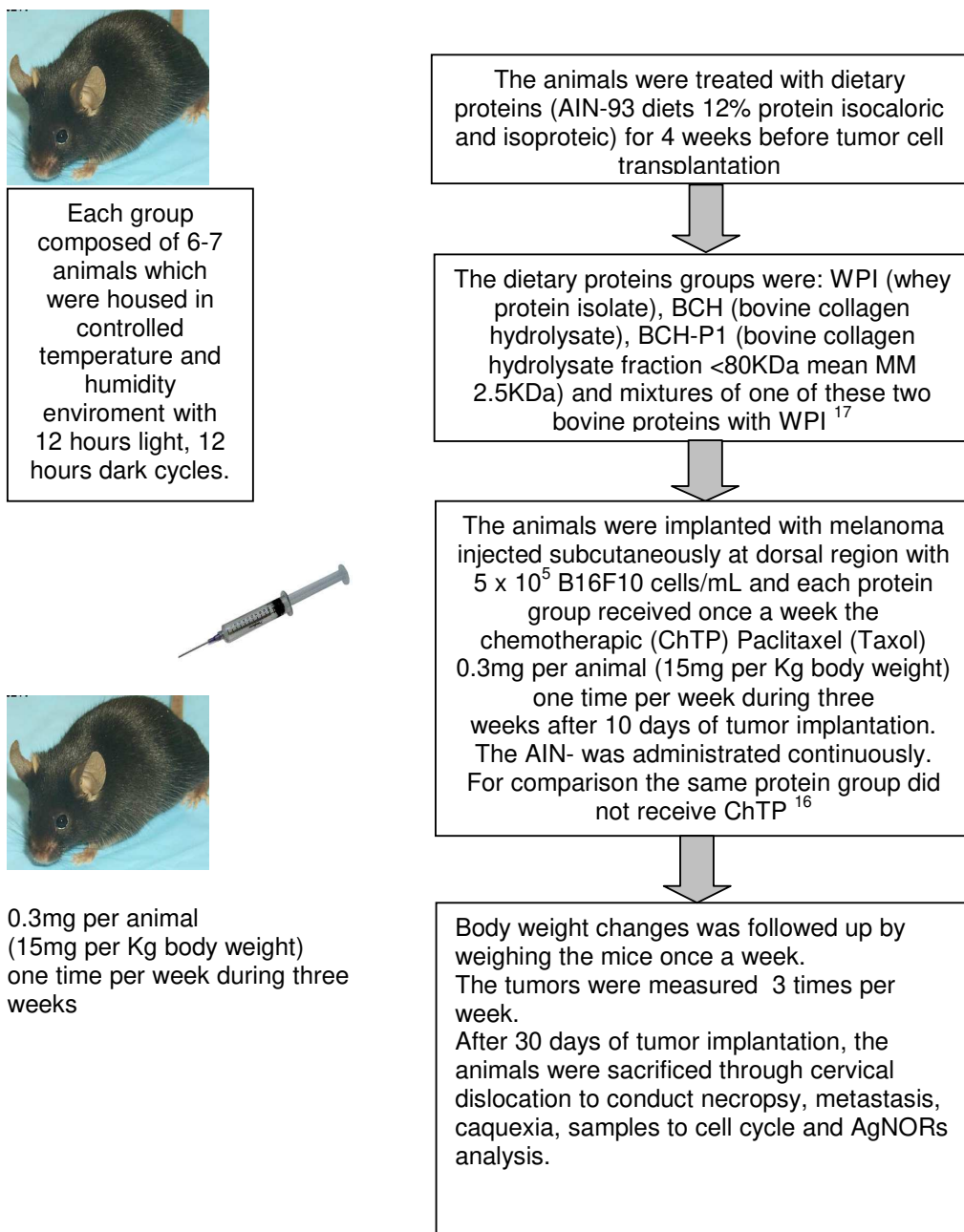


Figure 1. Summarized experimental protocol of tumorigenesis using C57BL/6J mice implanted with B16F10 melanoma tumor cells.

Murine tumoral strain culture. The cell culture of murine melanoma B16F10 provided by the Ludwig- Swiss Institute, Switzerland was cultivated in flasks with 75cm³ in a medium of RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% of fetal bovine serum inactivated (Cultilab), 2mM L-glutamine (Sigma Chemical Company), 1mM sodium pyruvate and the antibiotics (streptomycine 0.1mg/mL and ampicilin 0.1 mg/mL –Fontoura Wyeth AS). Before cell adherance, the cells were cultivated to multiply and maintain the strain, in order to be frozen in a medium of RPMI-1640 with 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Company) and stored in liquid nitrogen.¹⁸

The adherent cells suspensions (B16F10) were obtained using trypsin 0.2% in culture flasks for 5 minutes and then inactivated in fetal bovine serum at 10% concentration. The non-adherent cells were centrifuged twice to be resuspended in a medium RPMI-1640 supplemented. To count the cells a Malassez camera was used. Cell concentration was adjusted to 5×10^5 cells/mL in a medium with RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 7g of Polimixin-B (Sigma Chemical Company, St Louis Mo-USA). The cell viability expressed by non-staining cells was determined through exclusion test using Tripan Blue and was found to be superior to 95% viable cells.

Determination of cell cycle phases. Flow cytometry was applied to study cell cycle, which permitted to determine the kinetic parameters of cell population and provide the percentage of cells that were in phases G0/G1, S, G2/M and apoptosis. Samples of tumor cells from animals treated with collagen and whey proteins and also non-treated sample were collected and frozen immediately in sodium citrate

(2mM), sucrose 25 mM and 0.05% dimethylsulfoxide (DMSO), and stored in liquid nitrogen until the moment of use.¹⁹

After defrosting in ice bath the cells were incubated with 375 μ L of trypsin (Sigma) 0.03 g/L for 10 minutes at room temperature and neutralized using trypsin inhibitor (Sigma) 0.5 g/L, ribonuclease A (Sigma) 0.1 g/L and espermine (Sigma) 1.2 g/L. The samples were transferred to tubes of a flow cytometer and the cell counting at different cell cycle stage, apoptosis level (Sub-G1) and DNA content at S phase were obtained using Software Mod-fit. (Becton-Dickson).²⁰

AgNORs technique. The procedure to conduct AgNORs technique requires the imprint of tumor tissue which was removed from animals treated with the collagen and whey proteins immediately after they were sacrificed. The imprint was emerged in acetone (p.a.) for 5 minutes followed by washing with saline solution, then dried at room temperature. The imprinted material was stored at 4°C prior to staining.²¹

For staining it was necessary to emerge the imprinted material in a solution of colloidal silver prepared with one part of gelatin 2% dissolved in 1% formic acid mixed with two parts of silver nitrate solution (1:1). In the sequence the material was dried in a moisturized oven at 37°C for about 17-20 minutes. This time could be varied according to the tissue preparation procedure. Therefore, it is important to closely follow up the material during incubation at 37°C. After incubation, the material was washed with deionized water and sodium thiosulphate 1% for 1 minute at 37°C to complete the reaction. A second washing with water should be

applied following the drying of the material at room temperature. During the procedure it is necessary to avoid exposure to light.^{22, 23}

The results for each sample were submitted to statistical parametric and non-parametric analyses by using softwares PRISMA program, GraPad InStat.

Results

Evaluation of the results obtained from cell cycle phases determination (Figures 2 A,B and 3 A,B), showed that BCH and BCH-P1 + WPI treatments exhibited an increase of cells in the phase G0/ G1 (quiescent phase), relative to WPI treatment ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively).

Same general feature was observed for the treatments with chemotherapeutic drug added to the diets. An increase of cells in the G0/G1 phase relative to the treatment with WPI + ChTP was observed for BCH + ChTP and BCH-P1 + WPI + ChTP ($p<0.05$), indicating that these experimental conditions significantly inhibited the proliferative capacity of tumor cells. The treatment BCH + ChTP when used with WPI (BCH + WPI + ChTP) showed a relative decrease of cells in the phase G0/ G1 ($p<0.01$), indicating that WPI presents a different mechanism of cytotoxicity, by an increase of programmed cell death apoptosis phase ($p<0.01$) as shown in Figures 2B, 3B and 5A, 5B.

The percentage of cells in apoptosis for animals treated with WPI and BCH + WPI + ChTP increased significantly ($p< 0.01$), as shown in Figure 3 (A, B) and Figure 5 A.

The results of the present investigation show that WPI is probably an apoptosis inductor when administrated with BCH, as already reported by Marshall et al ²⁵ for a study with hamsters which were treated with whey protein in which a reduction of mucosite induced by the chemotherapeutic 5-fluoracil was demonstrated. This protective effect seemed to be related to the transforming growth factor beta (TGF- β) reducing the proliferation of basal epithelial cells.²⁵ The TGF- β could induce the

expression of cellular death receptors (Apo2-TRIAL) leading to cellular programmed death (apoptosis).²⁶ The synergistic effect found for the combination of BCH + WPI may also be the result of increased apoptosis, probably occurring through the same mechanisms.

The NOR pattern observed in each cell was classified according to the number of small dots and clusters, from which was obtained the total NORs for each cell nucleolus. The proliferative index is the percentage of total NORs increase(+) or reduction(-) in relation to tumor cells removed from mice C57BL/6J fed WPI, with (Figure 7) or without (Figure 6) chemotherapeutic drug and used as the control. All the data including mean $\pm$ sdm and statistical analysis for each protein diet group, with and without chemotherapeutic treatment are illustrated as total NORs related to WPI (A) or WPI + ChTP (B) in Figure 4 (A, B).

From Figure 4 (A) and Figure 6 one can notice that the proliferation indexes of tumor cells B16F10 from animals treated with BCH, BCH-P1 protein diets, and mixture of one of these two proteins with WPI were significantly higher ($p < 0.001$) than the WPI diet (control). The same general results were obtained with respect to the dot number/cell ($p < 0.001$).

When the comparisons are made between WPI + ChTP (control) and all the other groups also treated with ChTP drug (Figure 4B and Figure 7) no difference was found between the control and BCH + ChTP or BCH-P1 + ChTP ($P > 0.05$). However, a statistical difference ($p < 0.001$) was found between the control and BCH + WPI + ChTP, for both total NORs and dot number/ cell, nevertheless the

difference of BCH-P1 + WPI + ChTP with the control showed lower statistical significance ($p < 0.01$).

The cluster number did not show any statistical difference among all protein diet groups evaluated ($p > 0.05$).

Different protein diets influenced the tumor B16F10 cell's activity (proliferative index) in terms of total NORs parameters evaluated (Fig 4A, B). The proliferative index, difference between WPI and the other protein diets without the ChTP drug varied from 43.6% to 63.3%. The highest proliferate index was found for BCH-P1 + WPI (63%; $p < 0.001$) relative to WPI.

Comparing the treatments with the chemotherapeutic drug, proliferate indexes changed from -1.5% to 20.5%, significant at ($p < 0.001$) with exception of the treatment BCH + WPI + ChTP (1.1%; ns) relative to WPI + ChTP (control). Therefore, the chemotherapeutic treatment, as expected, reduced the proliferative activity in all diet groups and an apparent synergism was detected between BCH or BCH-P1 with the ChTP drug ($p < 0.001$), and the combination BCH-P1 + WPI + ChTP ($p < 0.01$). No statistical difference was found between BCH + WPI and BCH + WPI + ChTP treatment, therefore no apparent synergism in this case.

In the case of WPI (control diet) addition the ChTP drug significantly increased total NORs/ cell (Fig 4 A, B).

Discussion

The malignant invading tumor cells seem to establish contact with extracellular matrix proteins, including fibrillar collagen. In addition to provide physical barrier

against invasion, fibrillar collagen also restricts proliferation. It has been assumed that the growth regulation results of an indirect restrictive effect on cell spreading and cytoskeletal organization. The effect observed from collagen diets in cell cycle was also demonstrated by Wall et al ²⁷, which showed an inhibitory effect of fibrillar collagen on proliferation of human melanoma and fibrosarcoma cells that involves activation of the tyrosine kinase discoidin domain receptor 2 and is independent of effects on cell spreading. Cells plated in the presence of fibrillar collagen exhibited growth arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle. In the present study, only BCH and BCH-P1 + WPI without and with chemotherapeutic showed growth arrest in the G0/G1 phase, S and G2/M phases did not differ significantly from WPI or WPI +ChTP, respectively. On the other hand, BCH + WPI +ChTP exhibited increase in apoptosis percentage. Evaluating groups without ChTP treatment, BCH and BCH-P1 + WPI were the only ones which presented significant increase in apoptosis percentage.

Paclitaxel binds to the second globular domain of β tubulin, on the other side of the core helix from the GTPase domain²⁸. The precise effect of paclitaxel on microtubule dynamics depends on the assembled isotypes of β tubulin. The most conserved of the β tubulin residues in the pocket is Asp226²⁸. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. Microtubules are intrinsically dynamic polymers, and their dynamics play a crucial role in mitotic spindle assembly, the mitotic checkpoint, and chromosome movement. Taxol blocked cell cycle progress at the metaphase/ anaphase transition and inhibited

cell proliferation²⁹. Finally, an interesting recent finding is that paclitaxel is particularly effective as an anticancer agent because tubulin is not its only target. It also binds to a protein called Bcl-2, which normally blocks the process of apoptosis, or cell death. Paclitaxel, therefore plays a dual role in destroying dividing cells, firstly by stabilizing assembled microtubules and thereby halting mitosis, and secondly by inhibiting Bcl-2 and allowing apoptosis to proceed²⁸. Probably this taxol mechanism of action leads to different behaviour of dietary groups non-treated and treated with paclitaxel. For groups treated with ChTP, the apoptosis percentage increased only for BCH + WPI + ChTP, suggesting that taxol suppressed dynamics of individual microtubules or binds to the protein Bcl-2.

Cho et al ³⁰ demonstrated on Raw264.7 cell that ciclin D1, A and B1 were activated by bovine collagen type I (BIC) and also demonstrated that P13-kinase and the MAP kinases including JNK and ERK were involved in the restrictions of G1 and S phases in cell cycle. The P13-kinase and MKK1-mediated negative regulation by BIC in cell proliferation may be transmitted from the activation of cell surface receptors. BIC regulates negatively the proliferative capacity and also could stimulate inflammatory response due to fail to enhance the expression of innate nitrogen oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), suggesting that BIC-induction cell signaling differs from RGD (small peptide containing RGD sequence) activation alone. ³⁰ It was also evaluated (data not shown), some fractions of bovine and porcine collagens obtained from ultra and micro filtration and also from reverse phase chromatography. The fractions F collected from reverse phase column, demonstrated higher bioactivity against B16F10 melanoma

cells culture than original samples. Probably, some peptide sequences could be responsible for this effect, mainly from F1 and F2 fractions.

Detection of nucleolar organizer regions (NORs) associated proteins by binding to silver is a relatively new technique (AgNOR), which has the advantage of being simple, easy to perform, and a quick procedure. It can also be used on routinely fixed, paraffin wax embedded specimens, and can therefore be used for retrospective studies as well. All of these make of this technique a useful adjunct to the routine HE staining histopathological examination.

Dervan et al.³¹ suggested that the number of AgNOR increases with proliferative activity, degree of ploidy, and nucleolar dispersion. Through the argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) count and subjective AgNOR pattern assessment (SAPA) score in cytologic and histologic specimens of various skin tumors, it was concluded that melanoma cells showed a higher AgNOR count compared with squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma.³ The number of total NOR`s increased for all dietary groups non-treated with ChTP comparing with WPI group, it could be also shown through worse percentage mortality and survival rate, but the tumor volumes were not larger (data not shown). Therefore, the proliferative activity of the tumor seems not to be relevant, even when the number of total NOR`s was higher, it did not contribute to increase the tumor volume. The same trend was observed for dietary groups treated with ChTP, the number of total NOR`s was higher for BCH + WPI and BCH-P1 + WPI groups, which showed lower tumor volume, probably lower proliferative activity. These two dietary groups were

compared with WPI + ChTP that presented higher number of total NOR's in relation to WPI group (reference).

The value found for mean AgNOR counts in cutaneous melanoma was around 8.2.^{32, 33, 34} Leong et al.³⁴ suggested that melanoma cells can be differentiated from melanotic nevi on the basis of AgNOR, but a significant degree of overlap was reported by various authors. Naik et al.³⁵ found that AgNOR can be used as an adjunct to routine histopathologic examination, as they found AgNOR count of 1.06 ± 3.43 in benign nevi, and 4.26 ± 10.66 in malignant melanoma. Howat et al.¹⁰ suggested that AgNOR is of limited value in the prognostic of melanoma. Khanna et al.³ found that AgNOR count and score increased with increasing stage of the disease. AgNOR counts and SAPA score in melanoma were significantly higher as compared to nevi. No significant increase in AgNOR count and score was found with increase in radial diameter of melanoma in the present work.³ AgNOR count and SAPA score in melanoma were independent of nodal status. In the present study, the number of total NOR's were higher than 15 for dietary groups without ChTP, except for WPI group, and higher than 12 for dietary groups with ChTP treatment. The number of total NOR's seems to contribute for bad prognostic, but presenting smaller tumor volume and longer time of tumor growth, probably smaller proliferative activity according to Derenzini et al.³⁷

In different lines of human tumor cells cultured *in vitro*, the shorter the cell doubling time the greater is the amount of interphase AgNORs.^{4, 36} These data were confirmed *in vivo* by a study on the relationship between interphase AgNOR quantity and tumor mass doubling time of human cancer cell xenografts in athymic

mice. The relationship between interphase AgNOR quantity and cell doubling time can be explained by considering that proliferating cells have to produce an adequate ribosomal complement for the daughter cells and the shorter the cell cycle, the greater is the ribosome biogenesis per unit of time.⁴

The importance of the nucleolus in tumor pathology, the relationship between nucleolar size and function and tumor mass growth rate was studied *in vivo*.³⁷ Ten established human cancer cell lines from colon carcinomas and neuroblastomas were inoculated subcutaneously in athymic mice and the doubling time (DT) of the xenograft tumor mass was calculated.³⁷ The tumor DTs ranged from 3.2 to 15.7 days. The nucleolar area values were inversely related to the xenograft tumor mass DTs ($p < 0.001$). The present data demonstrate that the size and function of the nucleolus are related to the cell proliferation rate of cancer tissue. Evaluation of nucleolar size after silver staining of AgNOR proteins represents a unique parameter for the histological rapid assessment of cell proliferation in tumor lesions.

References

1. Sanjay A. Pai, Mie-Chi P. Cheung, Marvin M. Romsdahl, Asha S. Multani, Sen Pathak. Can Genetic Instability Be Studied at the Single Chromosome Level in Cancer Cells? Evidence from Human Melanoma Cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999, 109:51–57.
2. Shackney SE, Shankey TV. Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions. 1999. *Cytometr.*, 35:97-116.
3. Khanna AK, Giri AK, Khanna A, Kumar M. Nucleolar organizer region count and subjective AgNOR pattern assessment (SAPA) score in skin tumors. *J. Surg. Oncol.* 2001, 78:273-278.
4. Derenzini M. The AgNORs. *Micron.* 2000, 31:117–120.
5. Crocker J, Skilbeck N. Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J Clin Pathol.* 1987, 40:885-889.
6. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol.* 2000, 191: 181-186.
7. Evans AT, Orrell JM, Grant A. Re-evaluating silver-stained nucleolar regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: a study with quantitation and pattern analysis. *J Pathol.* 1991, 165:61-66.
8. Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J. Cell proliferation assessment in oncology. *Virchows Arch.* 1995, 427:323-327.

9. Pich A, Aloï F, Margaria E, Tomasini C. Argyrophilic nucleolar organizer region counts in malignant melanoma associated with benign intradermal nevus. *Dermatolog*. 1991, 183:246-252.
10. Howat AJ, Wright AL, Cotton DWK, Reeve S, Bleehen SS. AgNORs in benign dysplastic, and malignant melanocytic skin lesions. *Am J Dermatopathol*. 1990, 12:156-162.
11. Li LX, Crotty KA, Palmer AA. Argyrophilic staining of nucleolar organizer region count and morphometry in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol*. 2003, 25:3-7.
12. Barzilai A, Goldberg I, Yulash M. Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as a prognostic value in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*. 1998, 20:473-478.
13. Gambini C, Casazza S, Borgiani L. Counting the nucleolar organizer region-associated proteins is a prognostic clue of malignant melanoma. *Arch Dermatol*. 1992, 128:487-493.
14. Ronan SG, Farolan MJ, McDonald A, Manaligod JR, Das Gupta TK. Prognostic significance of nucleolar organizer regions (AgNORs) in malignant melanoma. *J Cutan Pathol*. 1994, 21:494-501.
15. Trerè D, Derenzini M, Sirri V, Montanaro L, Grigioni W, Faa G, Giovanna M, Columbano L, Columbano A. Qualitative and Quantitative Analysis of AgNOR Proteins in Chemically Induced Rat Liver Carcinogenesis. *Hepatolog*. 1996; 24:1269-1273.

16. Zhang X, Burt HM, Mangold G, Dexter D, Hoff DV, Mayer L, Hunter W. Anti-tumor efficacy and biodistribution of intravenous polymeric micellar paclitaxel. *Anti Cancer Drugs*. 1997, 8:696-701.
17. Reeves PG, Nilsen FH, Fahey JR. AIN-93 purified diet for laboratory rodents: Final report of the American institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76 Rodent Diet. *J Nutrit*. 1993,123:1939-1951.
18. Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. 3ed., Bethesda, Maryland, 47-51; 1972.
19. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometr*. 1983, 3(5):323-327.
20. Vermeulen K, Dirk R, Bockstaele V, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer; *Cell Prolif*. 2003, 36, 131–149.
21. Derenzini M, Pession A, Trere´ D. The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Laboratory Investigation*. 1990, 63:137–140.
22. Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature*. 1978, 273:345–349.

23. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000, 31:127–131.
24. Junqueira LCU, Junqueira MMS. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Editora Santos. 1983.
25. Marshall K. Therapeutic application of whey protein. *Alternat Medic Rev*. 2004, 9(2):136-156.
26. Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tiss Reseac*. 2004, 307(1):1-14.
27. Wall SJ, Werner E, Werb Z, DeClerk YA. Discoidin domain receptor 2 mediates tumor cell cycle arrest induced by fibrillar collagen. *The J Biolog Chem*. 2005, 280 (48): 40187-40194.
28. Amos LA, Löwe J. How Taxol stabilizes microtubules structure. *Chemist Biolog*. 1999, 6(3):R65-R69.
29. Yvon AMC, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molec Biol Cell*. 1999, 10: 947-959.
30. Cho MK, Suh SH, Lee CH, Kim SG. Bovine type I collagen inhibits Raw264.7 cell proliferation through phosphoinositide 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent down-regulation of cyclins D1, A and B1. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1744:47-57.

31. Dervan PA, Gilmartin LG, Loftus BM. Breast carcinoma kinetics. Argyphilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. *Am J Clin Pathol*. 1989, 92:401-407.
32. Fallowfield ME, Cook MG. The value of nucleolar organizer region staining in the differential diagnosis of borderline melanocytic lesions. *Histopathol*. 1989, 14:299-304.
33. Romão-Corrêa RF, Maria DA, Soma M, Sotto MN, Jr Sanches JA, Neto CF, Ruiz IRG. Nucleolar organizer region staining patterns in paraffin-embedded tissue cells from human skin cancers. *J Cutan Pathol*. 2005, 32:323-328.
34. Leong AS, Gilham P. Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum Pathol*. 1989, 20:257-262.
35. Naik R, Rghuveer CV, Jacob DL. Silver staining nucleolar organizer region (AgNOR) study in melanocytic skin tumor. *J Ind Med Ass*. 1997, 95:420-421.
36. Derenzini M, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Trerè D. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status. *J Clin Pathol*. 2004,57:755–761.
37. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol* 2000; 191: 181±186.

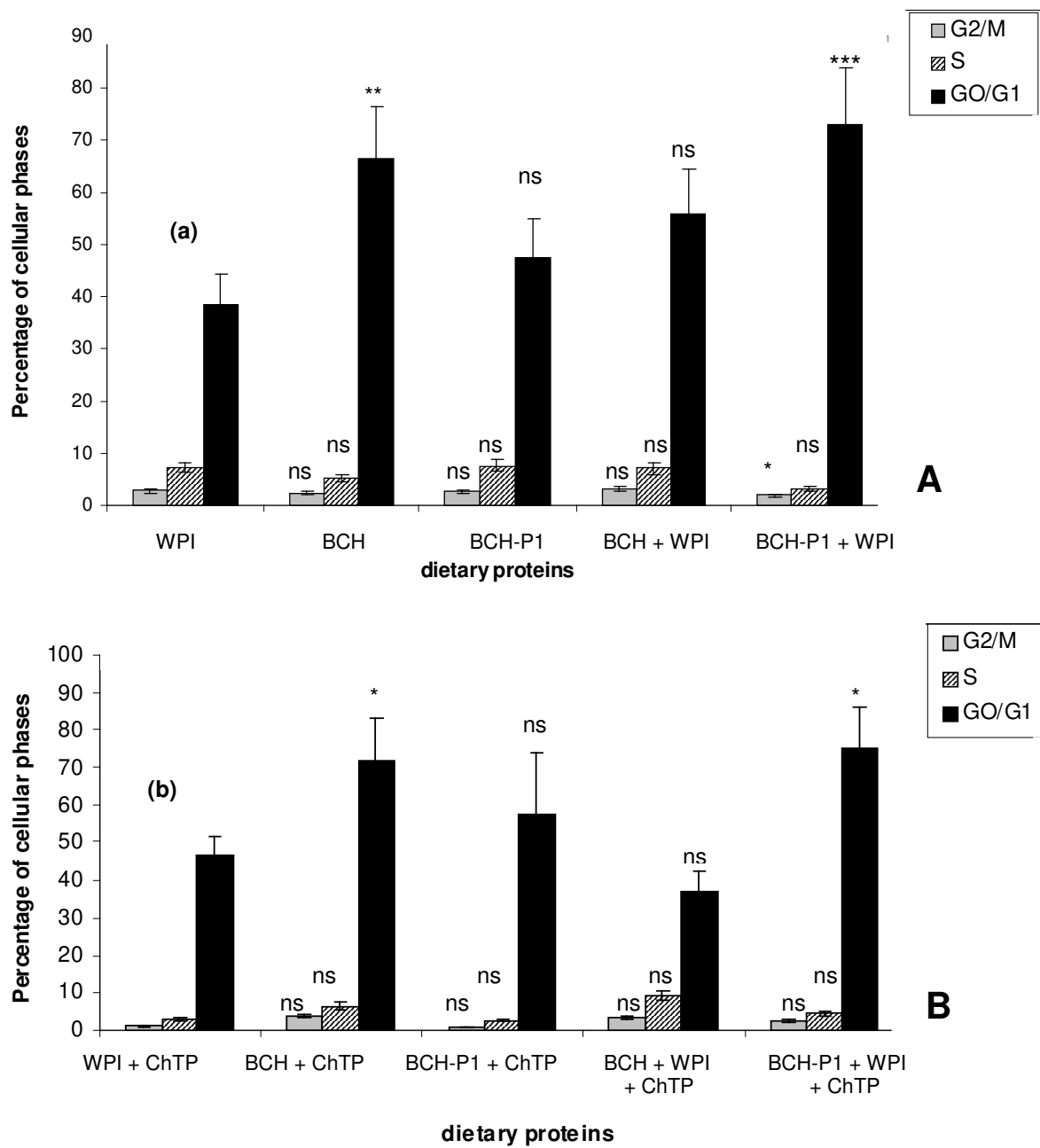


Figure 2 A, B. Distribution of cell cycle phases in B16F10 melanoma after treatment with different protein diets without or with chemotherapeutic treatment analyzed by flow cytometry. Statistical comparisons were made with treatment (a) or (b).

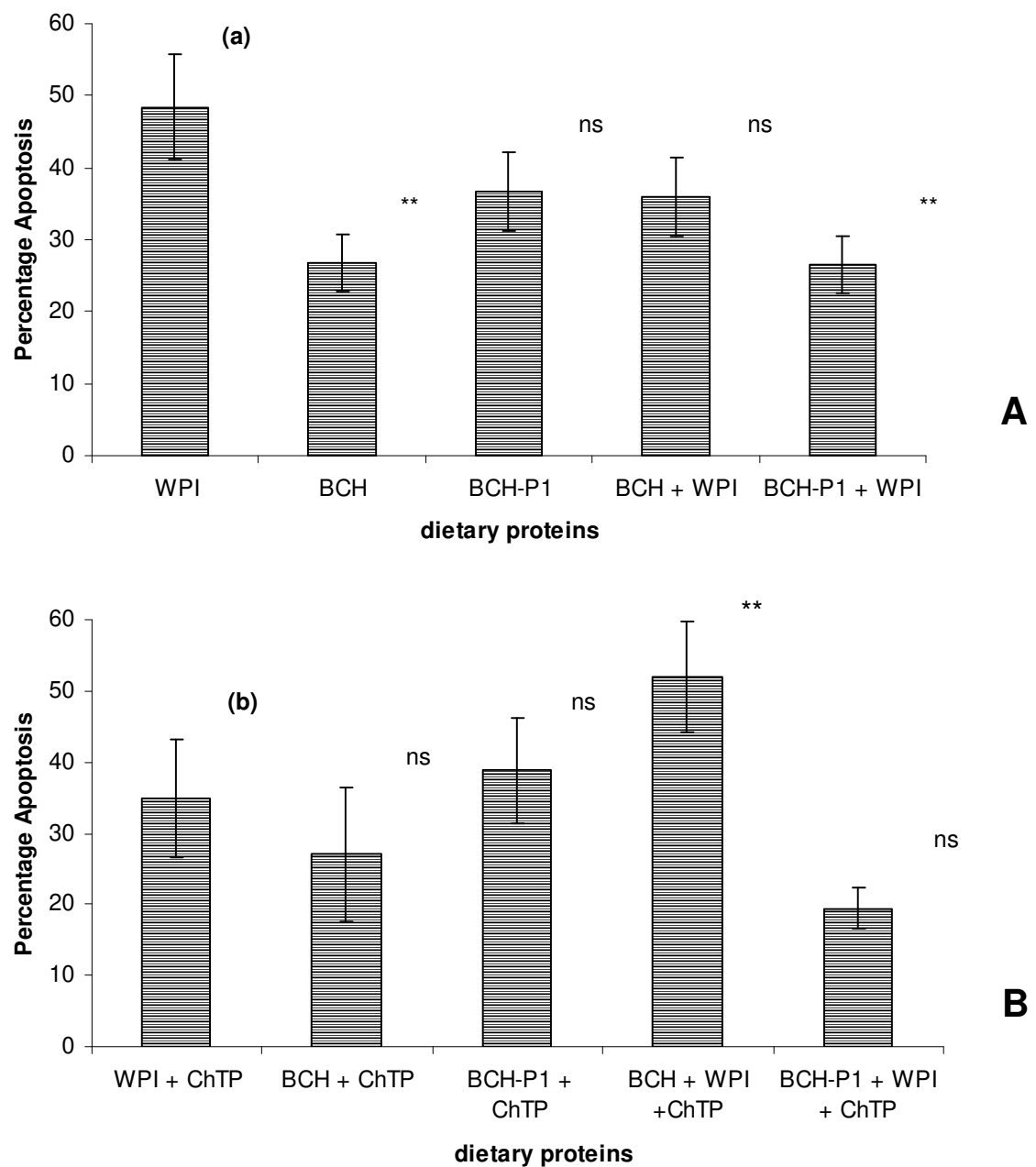


Figure 3 A, B. Distribution of apoptosis cell cycle phase in B16F10 melanoma after treatment with different protein diets without or with chemotherapeutic treatment analyzed by flow cytometry. Statistical comparisons with (a) or (b).

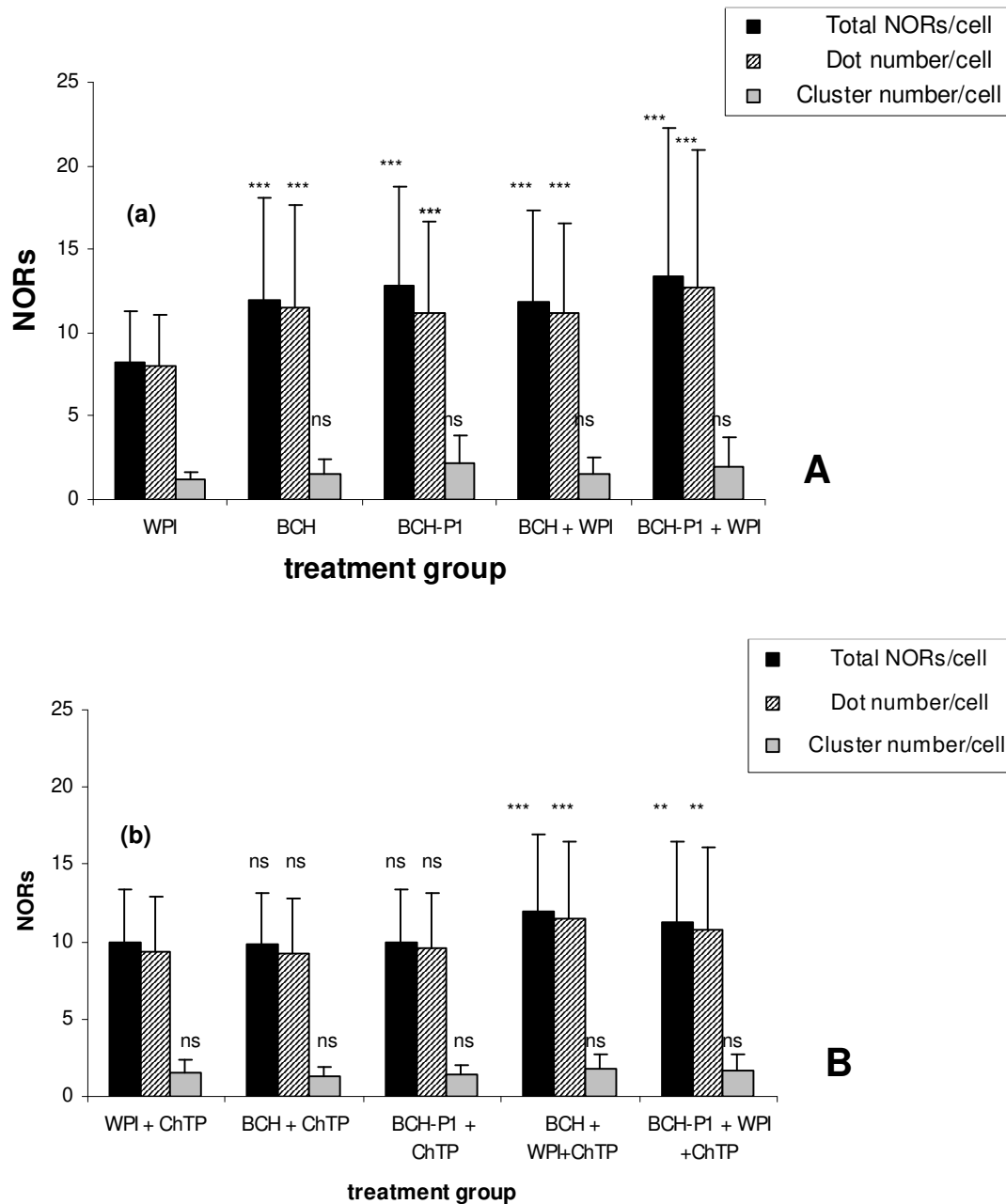


Figure 4 A, B. Measurement of silver-stained NORs nucleoli from melanoma tumor cells from animals that received different protein diets without or with chemotherapeutic drug. Contingency analysis – Fisher's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = not significant. A. Compared to WPI (whey protein isolate) diet group. B. Compared to WPI diet group treated with chemotherapeutic drug (WPI + ChTP) for each parameter: total NORs (nucleolar organizer regions), dots and clusters parameters.

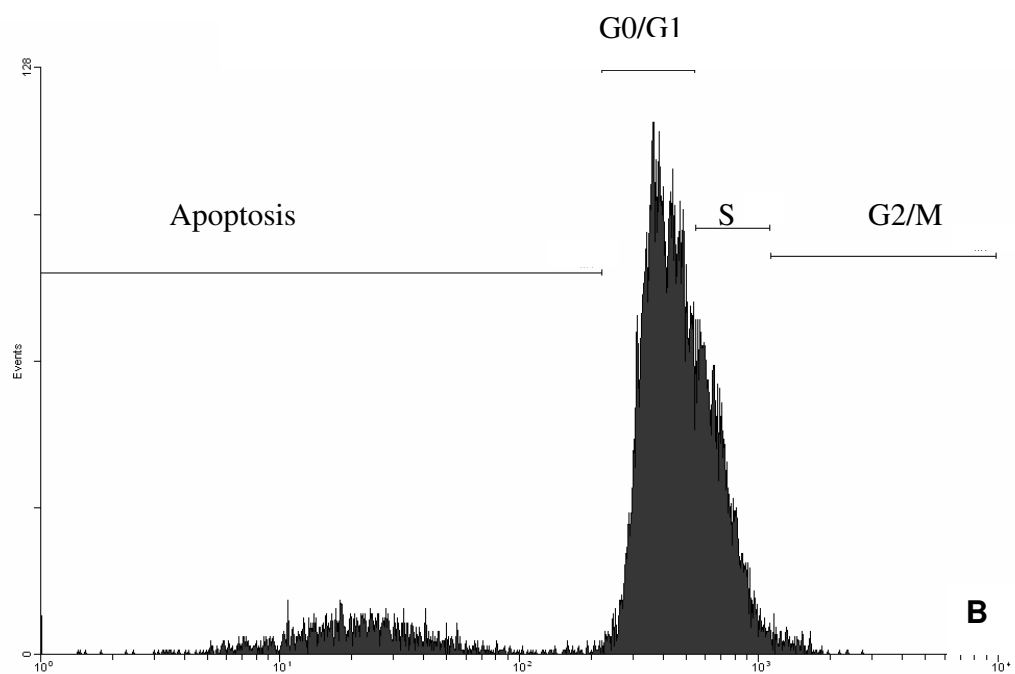
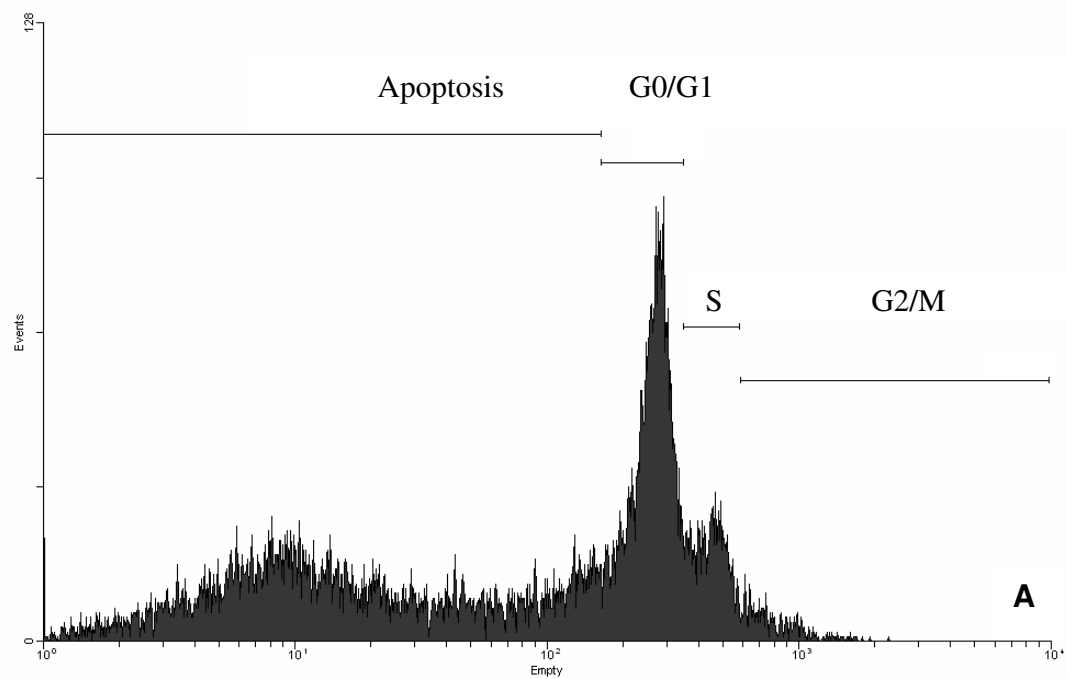


Figure 5 A, B. Histogram referred to cell cycle phases of BCH + WPI + ChTP group (A) and BCH-P1 + WPI + ChTP (B) analysed by flow cytometry (cell-quest - BD)

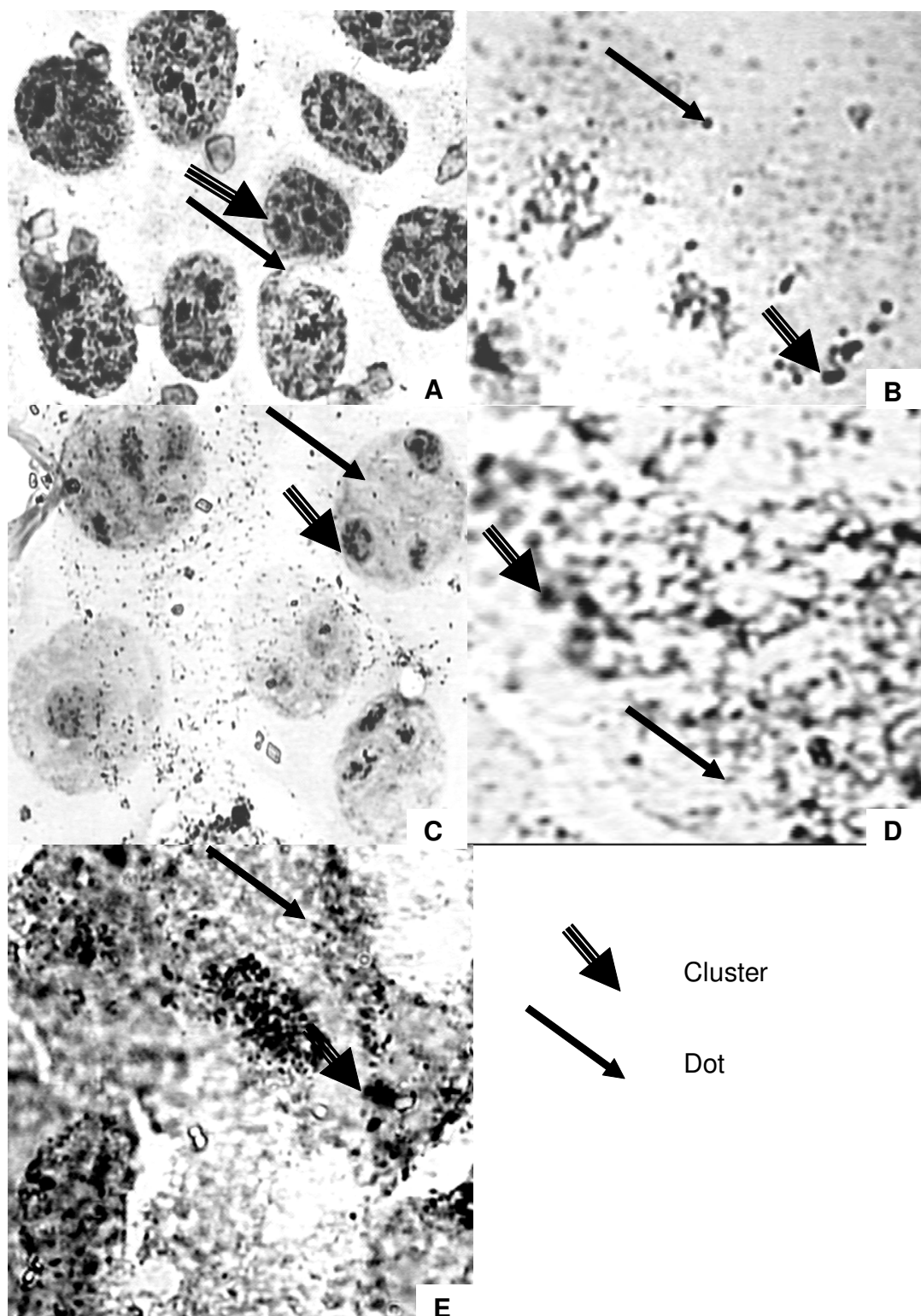


Figure 6 A, B, C, D and E. AgNOR's pictures of dietary protein groups without chemotherapeutic. A. WPI; B. BCH; C. BCH-P1; D. BCH + WPI and E. BCH-P1+WPI.

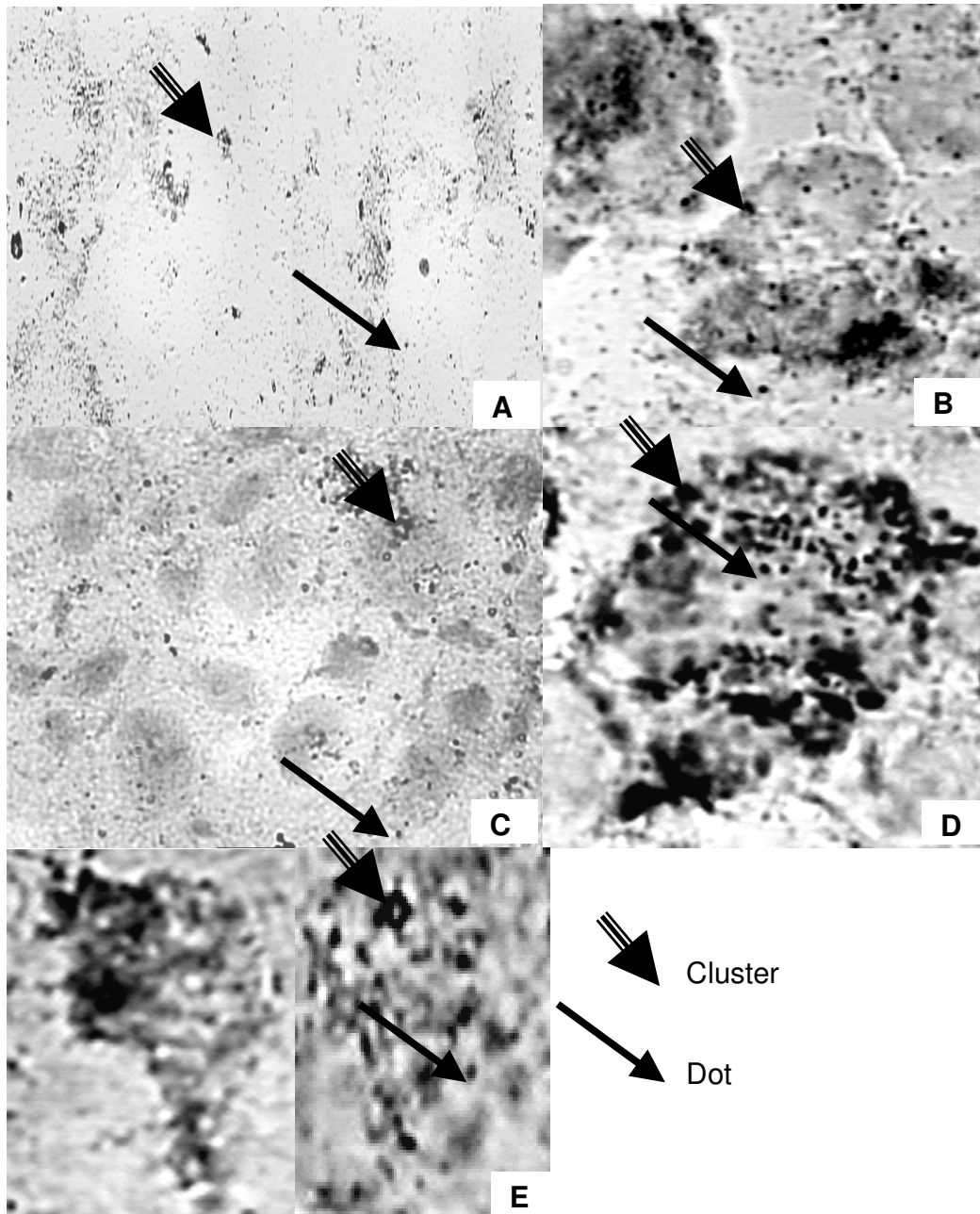


Figure 7 A, B, C, D and E. AgNOR's pictures of dietary protein groups with chemotherapeutic. A. WPI; B. BCH; C. BCH-P1; D. BCH + WPI and E. BCH-P1 + WPI.

4. CONCLUSÕES GERAIS

4. CONCLUSÕES

Ulcerogênese

Os colágenos hidrolisados bovino e suíno, e suas frações obtidas por microfiltração com diferentes massas moleculares, protegeram a mucosa gástrica dos ratos contra lesões ulcerativas causadas pelo etanol absoluto, reduzindo o índice de lesão ulcerativa (ILU) em até 75% quando administrado em dose única ou dupla intra-gástrico. A mistura WPI/ BCH na proporção 375:375 mg/Kg de peso corpóreo apresentou o melhor resultado, o qual reduziu o ILU em 76%. Os colágenos hidrolisados, bovino e suíno, apresentaram forte efeito na produção de muco, e o efeito do WPI foi também dependente dos compostos sulfidríla. Maior efeito protetor foi observado quando as duas proteínas foram administradas conjuntamente.

Tumorigênese

In vitro

Dentre as preparações de colágeno hidrolisado bovino, aquelas que apresentaram maior atividade inibitória (IC_{50}) no modelo com células B16F10 foram BCH-P1, F1, F2, F3 e F4. Não foi observada adesão das células de melanoma B16F10 nos hidrolisados de colágeno bovino e suíno.

A fase G2/M do ciclo celular foi inibida pelas amostras BCH-P1 e suas frações F, comparadas com o controle (sem amostra no meio). A amostra BCH-P1 apresentou aumento de porcentagem de células na fase G0/G1, retardando a entrada no ciclo celular sendo que as frações F1, F2 e F3 provocaram um aumento da apoptose. Estas frações (F1, F2, F3) apresentaram menor IC_{50} , maior apoptose, possivelmente pelo mecanismo da caspase-3.

In vivo

Dos grupos tratados com quimioterápicos, WPI+ ChTP apresentou o maior volume tumoral, enquanto que o grupo BCH+WPI+ChTP apresentou o menor volume. Este grupo também apresentou menor mortalidade e maior tempo e

porcentagem de sobrevida, com uma redução da carga tumoral de 90,6% em relação ao grupo WPI+ChTP. Os grupos tratados com WPI parecem induzir uma resposta imune com aumento do baço e aqueles tratados com derivados de colágeno parecem inibir a angiogênese na região próxima ao tumor. A combinação das duas proteínas (WPI + BCH) promoveu efeito positivo na inibição da tumorigênese.

A menor capacidade proliferativa e aumento da porcentagem de células na fase G0/G1 foram nitidamente observadas para os grupos de animais que receberam as proteínas, BCH ou BCH-P1 combinada com WPI, ambos com tratamento quimioterápico, sendo que os animais que receberam BCH+WPI +ChTP também apresentaram a maior porcentagem de apoptose.

ANEXOS

Anexo I: Trabalho publicado: Journal of Medicinal Food 10(1):154-157, 2007.

Anexo II: Equações de regressão para o cálculo da citotoxicidade (IC_{50}) das células de melanoma B16F10, in vitro.

Anexo III: Apresentações em Congresso Internacional (Resumos)

1. Efeito protetor dos derivados de colágeno nas lesões ulcerativas causadas pela administração oral do etanol, Simpósio Latino Americano de Nutrição (SLAN), Florianópolis, Nov., 2006.
2. Efeito antiulcerogênico da administração em ratos do isolado da proteína de soro de leite e colágeno hidrolisado, sozinho ou em combinação contra lesões ulcerativas induzidas pelo etanol, Simpósio Latino Americano de Nutrição (SLAN), Florianópolis, Nov., 2006.

Anexo IV: Apresentações em Congresso Internacional (Resumos)

1. Antiulcerogenic effect of administration in rats of a whey protein isolate (WPI) and collagen hydrolysates alone or in combinations, against ethanol ulcerative lesions, FENS, Paris, Jul., 2007.
2. Analysis of cell cycle and of proliferative capacity in mice bearing melanoma and maintained on different dietary proteins, FENS, Paris, Jul., 2007.

ANEXO I

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 10 (1) 2007, 000-000
© Mary Ann Liebert, Inc. and Korean Society of Food Science and Nutrition
DOI: 10.1089/jmf.2006.262

Protective Effect of Collagen Derivates on the Ulcerative Lesions Caused by Oral Administration of Ethanol

G.A. Castro,¹ V.C. Sgarbieri,¹ J.E. Carvalho,² S.V. Tinti,² and A. Possenti²

¹Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos;
and ²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual
de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

ABSTRACT The protective effect of beef and pig collagen hydrolysates and their fractions were tested as anti-ulcerogenic agents in rats (weighing 250–350 g) against ulcerative lesions caused by ethanol. Beef and pig collagen hydrolysates were fractionated by ultrafiltration into different molecular weight fractions. The protocol employed a negative and a positive control and a single dose of the experimental samples given by intragastric intubation. The beef collagen did not present a dose-response correlation in the ethanol model, whereas pig collagen showed a logarithmic dose-response relationship. Beef collagen hydrolysate decreased the ulcerative lesion index of 55% versus a 61% decrease for pig collagen hydrolysate at the same dosage (750 mg/kg of body weight). No significant differences were found ($P > .05$) between the hydrolysates and their fractions.

KEY WORDS: • collagen hydrolysates • mucosa protection • ulcerative lesions • ulcerogenic agent

INTRODUCTION

COLLAGEN HAS BEEN USED for tissue regeneration mainly because of some important properties such as immunogenicity, ionic capability to attract blood components that are essential to tissue regeneration, platelet aggregation induction in blood coagulation, mechanical protection to digestive tissues cells, and slow enzymatic digestibility, allowing it to remain in the digestive tract for enough time to promote tissue recovery.¹

The gastric mucosa is among the most important tissue in an organism on account of its function, structure, and pathological processes that can take place in it.² It is accepted that peptic ulcerogenesis (gastric and duodenal) results from an imbalance between an infectious agent such as the bacterium *Helicobacter pylori* or aggressive chemical agents versus protective substances like mucus, bicarbonate, prostaglandins, and sulfhydryl compounds as well as the blood flux to the mucosa cells.^{3–7}

Absolute ethanol acts by destroying mucosal cells by direct contact⁵ independently of the gastric acidity. It destroys initially the stomach's protective layers and finally reaches the superficial mucosa, causing cell necrosis and liberation

of vasoactive mediators leading to vasoconstriction, edema, and hemorrhage.⁸

In the present research work the possible protective effect of beef and pig collagen hydrolysates (BCH and PCH, respectively) against ethanol-induced ulcerative lesions was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Collagen hydrolysates

BCH and PCH were from a commercial production line (lots 40701 and EH 4517, respectively) and supplied by Gelita Group (Gelita South America), Cotia, São Paulo, Brazil. The two lots were fractionated by ultrafiltration using a polymeric membrane kit supplied by WGM (São Paulo), presenting different molecular mass cutoffs: (a) Koch membrane number 180 (4439-5 S4-M), molecular size cutoff 50–80 kDa; (b) Koch membrane number 131 (KM824936 3022N), molecular size cutoff 5–8 kDa; and (c) Koch membrane number 328 (KM830532-3003V), molecular size cutoff 1–2 kDa.

A solution of 25% (wt/vol) BCH or PCH was prepared and passed through the first membrane (a). The permeate from this membrane (P1) was passed through the second membrane (b), collecting a second permeate (P2), and finally the permeate P2 was passed through the third membrane (c), generating a permeate (P3). To the permeates were added 600 ppm hydrogen peroxide to preserve them until dehydration by spray-drying. The solutions were kept under

Manuscript received 16 March 2006. Revision accepted 20 July 2006.

Address reprint requests to: V.C. Sgarbieri, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, CP 6121. E-mail: sgarb@fea.unicamp.br

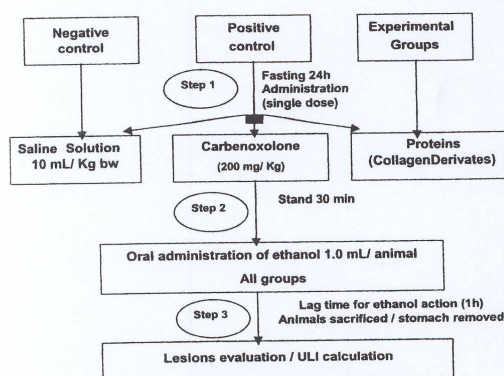


FIG. 1. Experimental ulcerogenesis protocol.

refrigeration to be spray-dried in the next day at a feeding temperature of approximately 130°C and an outlet temperature of 50°C.

Experimental ulcerogenesis protocol

F1 → The general protocol adopted in this investigation is illustrated in Figure 1. The rats (*Rattus norvegicus*) used were adult males of the Wistar strain weighing 250–350 g, acquired from the experimental animal colony of the University of Campinas, Campinas, São Paulo. Prior to the experiments, the animals were maintained for at least 7 days at the experimental laboratory at 20°C with alternating cycles of 12 hours light and 12 hours darkness, receiving commercial diet and water *ad libitum*.

The protocol used physiological saline (10 mL/kg of body weight) as the negative control, carbenoxolone (200 mg/kg of body weight), an antiulcerogenic drug, as the positive

control, and absolute ethanol (1 mL per animal) as the ulcerogenic agent. The experimental samples (BCH or PCH) were administered in single doses and in different amounts. The saline, the carbenoxolone, the ethanol, and the experimental samples were all given to the rats by intragastric intubation.

The protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Campinas.

Ulcerative lesion analysis

The ulcerative lesion index (ULI) was estimated by the summation of parameters, as follows⁹: loss of normal mucosa morphology, 1 point; discoloration, 1 point; mucosa edema, 1 point; hemorrhage, 1 point; petechial points (until nine), 2 points; petechial points (>10), 3 points; ulcers (up to 1 mm), number of ulcers found × 2 points; ulcers (>1 mm), number of ulcers found × 3 points; perforated ulcers, number of ulcers found × 4 points. Percent reduction of the ULI was calculated by the expression: % reduction of ULI = [(mean ULI negative control) – mean ULI testing sample]/[mean ULI negative control] × 100. The number of rats used in each test for the calculation of the ULI varied from six to 30, depending on variation encountered in the experiments.

The effective dose for 50% decrease of ULI (ED₅₀) was calculated by using increasing single doses (100, 200, 375, 750, 1,000, and 1,500 mg/kg of body weight) of the testing sample and a logarithmic correlation equation.

Statistical analysis

The experimental results were subjected to analysis of variance (ANOVA), and the criterion for critical statistical significance was 5% probability ($P < .05$). Comparison of means was done by Duncan's test.

RESULTS

Table 1 shows the reduction in the ULI due to intragastric intubation of increasing single doses of BCH. A reduc-

TABLE 1. ULI OBTAINED FOR CARBENOXOLONE AND BCH AT DIFFERENT CONCENTRATIONS, USING THE ETHANOL MODEL AND SINGLE-DOSE GASTRIC INTUBATION

Intragastric intubation, dosage (mg/kg of body weight)	Number of animals	ULI (mean ± SDM)	% reduction of ULI
Saline (10 mL/kg of body weight)	31	122.1 ± 28.1	—
Carbenoxolone (200)	30	17.4 ± 8.4 ^a	85.8
BCH			
50	6	122.7 ± 26.6 ^{NS}	0
100	22	98.7 ± 29.9 ^b	19.1
200	15	51.7 ± 21.1 ^a	52.7
375	12	59.7 ± 17.8 ^a	51.1
750	19	54.4 ± 19.8 ^a	55.4
1,000	12	62.7 ± 11.3 ^a	48.6
1,500	10	55.5 ± 11.8 ^a	54.5

SDM, standard deviation of the mean; NS, not significant. ANOVA $F_{(8,155)} = 56.71$, $P < .0001$ by Duncan's test. ^a $P < .001$, ^b $P < .01$.

TABLE 2. DOSAGE EFFECT FOR PCH USING THE ETHANOL MODEL AND SINGLE-DOSE GASTRIC INTUBATION

Intragastric intubation, dosage (mg/kg of body weight)	Number of animals	ULI (mean $\pm$ SDM)	% reduction of ULI
Saline (10 mL/kg of body weight)	36	122.1 $\pm$ 28.12	—
Carbenoxolone (200)	36	17.6 $\pm$ 8.4 ^a	85.5
PCH			
100	6	107.4 $\pm$ 19.2 ^{NS}	11.9
200	15	85.7 $\pm$ 24.9 ^b	29.8
375	20	70.5 $\pm$ 24.5 ^b	42.2
750	15	47.9 $\pm$ 19.4 ^a	60.7
1,000	16	53.2 $\pm$ 20.4 ^a	56.4
1,500	6	30.4 $\pm$ 5.3 ^a	75.1

SDM, standard deviation of the mean; NS, not significant.

ANOVA $F_{(7,149)} = 68.60$, $P < .0001$ by Duncan's test. ^a $P < .001$, ^b $P < .01$.

tion of the order of 20% in the ULI was observed for the dosage of 100 mg/kg of body weight, whereas a reduction of about 50–55% in the ULI from dosages ranging from 200 to 1,500 mg of BCH/kg of rat body weight was measured, with no statistical differences among these dosages. Therefore, BCH reached a maximum of 55% reduction in ULI at a dosage of 750 mg/kg of body weight with no reduction correlation in the range of 200–1,500 mg dosages/kg of body weight.

The anti-ulcerogenic drug carbenoxolone reduced the ULI by 86% at the dosage of 200 mg/kg of body weight. All the results are based on the use of physiological saline as negative control.

The efficacy of PCH to decrease the ULI is reported in Table 2. Contrary to the beef collagen, pig collagen presented a logarithmic dose–response relationship in the range

of single doses from 100 to 1,500 mg of PCH/kg of rat body weight. The reduction in ULI ranged from 12% (at 100 mg) to 75% (at 1,500 mg/kg of body weight).

The logarithmic equation and the curve showing this relationship are shown in Figure 2. This equation permitted a calculation of an ED₅₀ of 541 mg of pig collagen/kg of rat body weight.

Compared with the saline treatment, 200 mg/kg of body weight carbenoxolone reduced the ULI by 85.5% ($P < .001$). At a dosage of 750 mg/kg of body weight pig collagen reduced ULI by 60.7%, while for beef collagen the reduction was about 55%.

The comparative effect of a single dose of 200 mg/kg of body weight of BCH and its hydrolysate fractions (P1, P2, and P3) in the reduction of the ULI is shown in Table 3. Relative to the physiological saline the beef hydrolysate did not differ from the beef P3 fraction ($P > .01$), but both differed from the beef P1 and P2 fractions, which differed from saline at only $P < .05$. Carbenoxolone (an anti-ulcerative drug), also relative to saline, differed from all the collagen samples ($P < .001$) with a reduction in the ULI of 83.7%.

Table 4 comparatively shows the difference in ULI reduction between carbenoxolone and the PCH samples. Carbenoxolone reduction of 83.7% was statistically different from the collagen samples, which reduced the ULI in the range of 47–53% with no statistical differences among themselves ($P > .01$).

DISCUSSION

Ethanol is an ulcerogenic agent that acts on the stomach mucosa promoting lesions and causing stomach acid secretion, decreased prostaglandin production, increased acetylcholine content, and increased intracellular calcium level. These are all factors that increase gastric secretion in various kinds of stress.¹⁰ Inflammatory response may take place as a consequence of the gastric mucosa ulcerogenesis involving cellular proliferation, cellular motility, chemotactic events, adherence phenomenon, vasodilation, increased

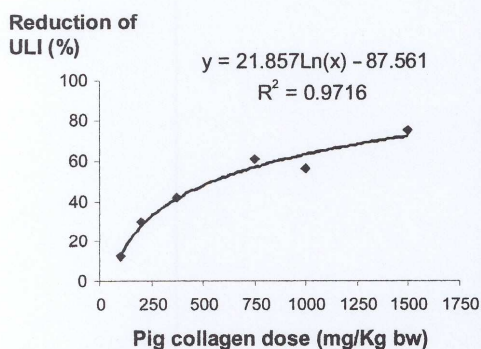


FIG. 2. Logarithmic regression curve and equation of dose-effect of pig collagen on reduction of the ULI for the ethanol model of stomach ulcer induction in rats. In the equation shown, x is mg of tested sample, and y is percent reduction ULI.

TABLE 3. DOSAGE EFFECT FOR BCH AND ITS FRACTIONS P1, P2, AND P3 USING THE ETHANOL MODEL AND SINGLE-DOSE GASTRIC INTUBATION

Intragastric intubation, dosage (mg/kg of body weight)	Number of animals	ULI (mean $\pm$ SDM)	% reduction of ULI
Saline (10 mL/kg of body weight)	17	124.3 $\pm$ 40.24	—
Carbenoxolone (200)	18	20.28 $\pm$ 4.39 ^a	83.7
BCH (200)	23	73.96 $\pm$ 34.06 ^b	40.5
BCH-P1 (200)	6	87.33 $\pm$ 22.29 ^c	29.7
BCH-P2 (200)	6	94.00 $\pm$ 32.80 ^c	24.4
BCH-P3 (200)	6	79.50 $\pm$ 21.81 ^c	36.0

SDM, standard deviation of the mean.

ANOVA $F_{(5,75)} = 22.22$, $P < .0001$ by Duncan's test. ^a $P < .001$, ^b $P < .05$, ^c $P < .01$.

TABLE 4. DOSAGE EFFECT FOR PCH AND ITS FRACTIONS P1, P2, AND P3 USING THE ETHANOL MODEL AND SINGLE-DOSE GASTRIC INTUBATION

Intragastric intubation, dosage (mg/kg of body weight)	Number of animals	ULI (mean $\pm$ SDM)	% reduction of ULI
Saline (10 mL/kg of body weight)	17	124.3 $\pm$ 40.24	—
Carbenoxolone (200)	18	20.28 $\pm$ 4.39 ^a	83.7
PCH (750)	21	57.90 $\pm$ 23.00 ^a	53.04
PCH-P1 (750)	6	60.50 $\pm$ 18.85 ^a	51.3
PCH-P2 (750)	12	66.33 $\pm$ 26.49 ^a	46.6
PCH-P3 (750)	6	62.50 $\pm$ 14.47 ^a	49.7

SDM, standard deviation of the mean.

ANOVA $F_{(5,79)} = 30.32$, $P < .0001$ by Duncan's test. ^a $P < .001$.

blood flow, and alterations in metabolic, secretory, and cellular receptor functions.^{11,12}

Leukocytes passing through the endothelium reach the tissues and interact with proteins present in the extracellular matrix such as the collagen. The leukocytes' migration involves adhesion of cells as integrins, using proteins such as collagen, laminin, and fibronectin as ligands.^{11,12} The function of collagen is to offer mechanical resistance to the tissues that could be measured through immature and mature collagen present in the mucosa or tissue lesions.

Some investigators¹³⁻¹⁶ have demonstrated that collagen and collagen hydrolysate can stimulate proliferation of cells such as chondrocytes and adipocytes and extracellular matrix proteins. Type I bovine tendon collagen was used to recover duodenal mucosal lesion produced by *Phaseolus vulgaris* lectin.¹

The results of the present work permit the conclusion that both PCH and BCH, and their fractions of different molecular weight ranges, protect the rat stomach mucosa against ulcerative lesions caused by ethanol, reducing the ULI up to 75% on single-dose intragastric administration.

To the authors' knowledge this is the first work demonstrating the anti-ulcerogenic effect of either BCH or PCH. Some possible mechanisms through which collagen hydrolysates can protect the stomach mucosa from ethanol lesions are being investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support given by Gelita South America, Cotia, SP, and also the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, SP, Brasil.

REFERENCES

1. Santos CDI: Ação do colágeno extraído de tendões bovinos (colágeno tipo I) na recuperação de lesões da mucosa duodenal induzidas por lectinas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) [Dissertação de mestrado], Departamento de Ciência da Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1992.
2. Melo JRC, Castro JP, Lanna JCB, Guimarães JT, Sobrinho JMDL: Anatomia do estômago e anatomia do desenvolvimento. In: *Gastroenterologia Clínica, Vol. 1* (Dani R, Castro LP, eds.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1993, pp. 449-459.
3. Kontarek SJ: Mechanisms of gastric protection. *Scand J Gastroenterol* 1993;174(Suppl):15-28.
4. Abdel-Salam DME, Czimmer J, Debreuni A, Szolesanyi J, Mozsik G: Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol* 2001;95:105-127.
5. Robert A: Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979;77:761-767.
6. Allen A, Flemström G, Garner A, Kivilaasko E: Gastrointestinal mucosal protection. *Physiol Rev* 1993;73:823-857.

ANEXO II

Samples ^a	Equations
BCH	$Y = -0.0037X + 0.47$
BCH-P1	$Y = -0.0021X + 0.4193$
BCH-P2	$Y = -0.0028X + 0.5286$
BCH-P3	$Y = -0.0054X + 0.5918$
R1	$Y = -2E-06X^2 + 0.0162X + 25.706$
R2	$Y = 5E-07X^2 + 0.0158X + 14.64$
R3	$Y = -1E-06X^2 + 0.0238 + 10.648$
R4	$Y = 1E-06X^2 + 0.0078X + 8.2147$
R5	$Y = 2E-07X^2 + 0.0219 + 10.494$
P5	$Y = 4E-06X^2 - 0.0038X + 19.004$
F1	$Y = 0.0002X^2 + 0.0188X + 19.876$
F2	$Y = -0.0002X^2 + 0.2812X + 2.7685$
F3	$Y = 0.0004 X^2 - 0.0824 + 13.637$
F4	$Y = 0.0004 X^2 - 0.103X = 18.882$
PCH	$Y = -0,0016X + 0,3743$
PCH-P1	$Y = -0,0025X + 0,4165$
PCH-P2	$Y = -0,0014X + 0,4017$
PCH-P3	$Y = -0,0023X + 0,4289$
WPI	$Y = 2E-06 X^2 - 0.008X + 10.132$

^aBCH: bovine collagen hydrolysate; BCH-P1: bovine collagen hydrolysate (fraction P1); BCH-P2, BCH-P3: bovine collagen hydrolysate (fractions P2 and P3). R1-R5: retentates of BCH-P1 on different ultrafiltration Millipore membranes; P5: permeate from R5; F1-F4: fractions from RP-HPLC chromatography of BCH-P1; PCH: porcine hydrolysate; PCH-P1, PCH-P2, PCH-P3 (fractions P1, P2, P3) from PCH; WPI: whey protein isolate.

ANEXO III



EFEITO PROTETOR DOS DERIVADOS DE COLÁGENO NAS LESÕES ULCERATIVAS CAUSADAS PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO ETANOL.

Castro, G.A. Mestre em Tecnologia de Alimentos e Doutorado no Departamento de Nutrição e Alimentos na Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, gcastro@fea.unicamp.br; Carvalho, J.E. Pesquisador CPOBA - Unicamp, carvalho@cpoba.unicamp.br; Spagnol, V.C. Departamento de Nutrição e Alimentos na Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, spagnol@fea.unicamp.br



Introdução

Amostras do colágeno hidrolisado bovino (BCH) e suíno (PCH) e seus derivados foram avaliados no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol quanto ao seu efeito anti-ulcerogênico. O BCH e PCH foram fracionados por ultra-filtragem em diferentes faixas de massas moleculares.

Objetivo

Avaliar o efeito anti-ulcerogênico dos colágenos hidrolisados bovino (BCH) e suíno (PCH) e suas frações de diferentes massas moleculares no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

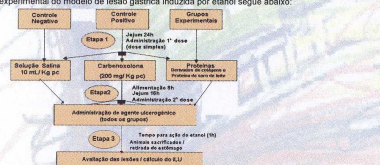
Metodologia

Os colágenos bovino e suíno foram fornecidos pela GELITA SOUTH AMERICA, Cotia, SP, Brasil. Dois lotes foram fracionados por ultra-filtragem utilizando membrana polimérica, kit fornecido pela WGM, São Paulo, Brazil, com diferentes porosidades, diferentes perfis de massas moleculares.

a) KOCH membrane N° 180 (4439.5 S4-M) porosidade com faixa de massa molecular de 50K-80K;
b) KOCH membrane N° 131 (KM624936 3022N) porosidade com faixa de massa molecular de 10K-80K;
c) KOCH membrane N° 328 (KM630512-3003V) porosidade com faixa de massa molecular de 1K-20K.

Solução de colágeno hidrolisado à 25% (p/v) foi preparada e passada através da primeira membrana (a). O permeado desta primeira membrana (P1) foi passado pela segunda membrana (b) coletando o segundo permeado (P2) e finalmente o permeado P2 foi passado através da terceira membrana (c) gerando um terceiro permeado (P3). Aos permeados foi adicionado 600ppm de ácido de hidrógeno para preservar as soluções de colágeno hidrolisado até o momento da secagem em spray drying. As soluções foram manidas sob refrigeração para serem secas no dia seguinte. As condições de secagem foi utilizando uma temperatura de entrada de aproximadamente 130°C e uma temperatura de saída de 50°C.

• O protocolo experimental do modelo de lesão gástrica induzida por etanol segue abaixo:



• Experimento Agudo: Foram usados ratos do sexo masculino Wistar adultos, com 250 – 350g peso corpóreo. Os animais foram divididos em grupos de 5 - 8 animais, eles foram submetidos a um jejum de 24 horas, com acesso livre à água e então cada grupo recebeu uma intubação (gavagem) oro-gástrica com o tratamento correspondente.

• Índice de lesão ulcerativa (ILU): O índice de lesão ulcerativa foi calculado considerando a soma total dos parâmetros abaixo, de acordo com metodologia relatada (1).

- Até 10 petéquias (pontas)
- Até 20 petéquias
- Até 30 petéquias
- Úlceras até 1 mm
- Úlceras maiores que 1 mm
- Pontos de hemorragia
- Perda de pregas
- Perda de cor

*n = número de lesões encontradas.
Para determinar a porcentagem a porcentagem de inibição do ILU apresentada pelos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo, a seguinte equação será usada:

$$\% \text{ de redução do ILU} = \frac{\text{média do controle negativo} - \text{média do grupo tratado com a amostra}}{\text{média do controle negativo}} \times 100$$

• Estimativa da dose efetiva para a redução de 50% do índice de lesões ulcerativas (DE50) – Para se estimar a dose efetiva (DE50) que causa a redução de 50% do efeito ulcerogênico, uma curva dose-efeito foi determinada usando o experimento agudo e o modelo ulcerativo do etanol como já foi descrito. Os animais foram tratados com doses crescentes 100, 200, 375, 750, 1500 mg/Kg pc do colágeno hidrolisado bovino e suíno e suas frações de diferentes massas moleculares e então mensurado o efeito anti-ulcerativo. O valor DE50 foi obtido através de equações de regressão estabelecidas com base no tipo de curva experimental obtida (modelo ajustado).

Resultados

Índice de lesão ulcerativa do colágeno hidrolisado bovino utilizando o modelo de etanol por intubação oro-gástrica em dose simples:

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	31	122.1±28.1	
Carboxoxolona	200	30	17.4±5.4***	85.8
BCH	50	6	122.7±26.6 ^{ns}	0
BCH	100	22	98.7±29.9**	19.1
BCH	200	15	51.7±21.1***	52.7
BCH	375	12	59.7±17.5***	51.1
BCH	750	19	54.4±19.8***	55.4
BCH	1000	12	62.7±11.3***	48.6
BCH	1500	10	55.5±11.5***	54.5

Anova F (8,155) = 56.71; p<0.0001. Teste de Duncan test, ns= não significativo, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, referente a salina.

(a) Dosagem da Salina 10 mL/Kg pc.

Índice de lesão ulcerativa do colágeno hidrolisado suíno utilizando o modelo de etanol por intubação oro-gástrica em dose simples

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	36	122.1±28.12	
Carboxoxolona	200	36	17.6±8.4***	85.5
PCH	100	6	107.4±19.2 ^{ns}	11.9
PCH	200	15	85.7±24.9**	29.8
PCH	375	20	70.5±24.5**	42.2
PCH	750	15	47.9±19.4***	60.7
PCH	1000	16	53.2±20.4***	56.4
PCH	1500	6	30.4±5.3***	75.1

Anova F (7,149) = 66.80; P<0.0001 Teste de Duncan, ns= non significant, ** p<0.01, *** p<0.001 (a) Dosagem da salina 10 mL/Kg pc.

Efeito da dosagem do colágeno hidrolisado bovino (BCH) e suas frações P1, P2, P3 utilizando o modelo de etanol em dose simples por intubação oro-gástrica na redução de ILU em ratos

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	17	124.3±40.24	
Carboxoxolona	200	18	20.28±4.39***	83.7
BCH	200	23	73.96±34.06**	40.5
BCH-P1	200	6	87.33±22.23*	29.7
BCH-P2	200	6	84.00±52.80*	24.4
BCH-P3	200	6	79.50±21.81**	36.0

Anova F (5,75) = 22.22; P<0.0001. Teste de Duncan, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 referente a salina. (a) Dosagem da Salina de 10 mL/Kg pc.

Efeito da dosagem do colágeno hidrolisado suíno (PCH) e suas frações P1, P2, P3 utilizando o modelo de etanol em dose simples por intubação oro-gástrica na redução de ILU em ratos

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	17	124.3±40.24	
Carboxoxolona	200	18	20.28±4.39***	83.7
PCH	750	21	57.80±23.00***	53.4
PCH-P1	750	6	60.50±18.85***	51.3
PCH-P2	750	12	66.33±26.49***	46.6
PCH-P3	750	6	62.50±14.47***	49.7

Anova F (5,79) = 33.32; P<0.0001. Teste de Duncan, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, referente a salina. (a) Dosagem da Salina de 10 mL/Kg pc.

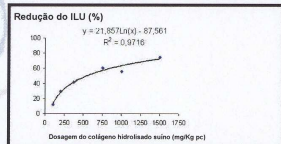


Figura 1. Curva de regressão logarítmica e equação dose-efeito do colágeno hidrolisado suíno (PCH) na redução do ILU pelo modelo do etanol de indução de úlcera gástrica no estômago em ratos. A equação, x = mg de amostra testada, y = % de redução do ILU.

Conclusão

• Colágeno hidrolisado bovino (BCH) atingiu um índice de lesão ulcerativa (ILU) máximo de 55% de redução na dose de 200 mg/Kg pc, sem nenhuma correlação de redução do ILU entre a taxa de concentração de 200 a 1500 mg/Kg pc peso corpóreo.

• Contrariamente ao BCH, o colágeno hidrolisado suíno (PCH) apresentou uma dose resposta com correlação logarítmica na taxa de concentração de 100 a 1500 mg de PCH por Kg de peso corpóreo do rato. A redução em ILU variou de 12% (10mg) a 75% (1500 mg/Kg bw).

• A dose efetiva 50% do PCH foi calculado pela correlação logarítmica em DE50 igual a 541 mg/Kg pc.

• O BCH e PCH na mesma dosagem de 750 mg/Kg pc apresentaram 60,7% e 55% de redução no ILU comparados com a carboxoxolona (controle positivo) que atingiu 85,5% (p<0.001).

• Baseado no controle negativo (solução salina fisiológica), o BCH não diferiu da fração bovina P3 (p<0.01), mas ambos diferiram das frações bovinas P1 e P2, as quais diferem também da salina (p<0.05).

• O PCH e suas frações que apresentaram uma redução no ILU de 47% a 52% não diferiram estatisticamente entre si (p<0.01). A carboxoxolona reduziu 83,7% no ILU em relação a salina e diferiu estatisticamente das demais amostras de colágeno hidrolisado.

• Os resultados do presente estudo permitem concluir que os colágenos hidrolisados bovino e suíno, e suas frações de diferentes massas moleculares, apresentam ação protetora à mucosa gástrica contra lesões ulcerativas causadas pelo etanol, reduzindo o índice de lesão ulcerativa (ILU) até 75% em dose simples por administração oro-gástrica.

Referências

- Gambier MT, Skonje LA, Soucar C, Lapa AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from Baccharis igitaria Mart. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1991; 86:137-9.
- Santos GD. Ação do colágeno extraído de tendões bovinos (colágeno tipo I) na recuperação de lesões da mucosa duodenal induzidas por lectinas de feijão (Phaseolus Vulgaris). Dissertação de mestrado do Departamento de Ciência da Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1992.
- Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of 14C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57BL/6). J Nutr 1995; 125:1891-1896.
- Konturek SJ. Mechanisms of gastroprotection. Scand J Gastroenterol. 1993; 174 (Suppl):10-28.
- Robert A, Nezami JE, Saito S, Nagy L, Paveletti M. Glutathione, protein sulphydryl and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. Clin Chim Acta. 1992; 206:95-105.
- Saito S, Nagy L, Paveletti M. Glutathione, protein sulphydryl and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. Clin Chim Acta 1992; 206: 95-105.



EFEITO ANTIULCEROGÊNICO DA ADMINISTRAÇÃO EM RATOS DO ISOLADO DA PROTEÍNA DE SORO DE LEITE E COLÁGENO HIDROLISADO, SOZINHO OU EM COMBINAÇÃO CONTRA LESÕES ULCERATIVAS INDUZIDAS PELO ETANOL.

Castro, G.A. Mestre em Tecnologia de Alimentos e Doutoranda no Departamento de Nutrição e Alimentos na Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, zenegosa@fea.unicamp.br; Carvalho, J.E. Pesquisador CPQBA - Unicamp, carvalho@cpqba.unicamp.br; Sgarbi, VC. Departamento de Nutrição e Alimentos na Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, sgarbi@fea.unicamp.br

GELITA
SOUTH AMERICA

Introdução

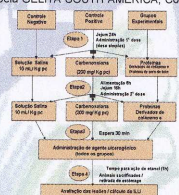
Amostras isoladas e combinadas do isolado protéico de soro de leite bovino (IPSLB), colágeno bovino (BCH) e suíno (PCH) foram avaliadas no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. O mecanismo de redução de índice de lesão ulcerativa gástrica foi avaliado quanto a produção de muco e prostaglandina na mucosa, gastrina e somatostatina plasmática e alquilação de compostos sulfidrílicos por N-etilemaleimide.

Objetivo

Avaliar o efeito antiulcerogênico do IPSLB e dos colágenos bovino e suíno em combinação no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol e seu mecanismo.

Metodologia

O IPSLB foi obtido por fracionamento com membranas de micro e ultrafiltração. Os colágenos bovino e suíno foram fornecidos pela GELITA SOUTH AMERICA, Cota, SP, Brasil. O protocolo experimental segue abaixo:



- Experimento Agudo:** Foram usados ratos do sexo masculino Wistar adultos, com 250 – 350g peso corpóreo. Os animais foram divididos em grupos de 5 – 6 animais, eles foram submetidos a um jejum de 24 horas, com acesso livre à água e então cada grupo recebeu uma intubação (gavagem) oro-gástrica com o tratamento correspondente.
- Experimento Doses Repetidas:** Os controles negativo, positivo e os grupos teste foram tratados com a solução salina fisiológica, ou agente antiulcerogênico ou com as proteínas teste após jejum de 24 horas, de acordo com o experimento agudo. Após tratamento com a primeira dosagem, os animais foram alimentados por 8 horas com rações comerciais, seguidos de jejum com água à vontade por 16 horas. Após este procedimento receberam a segunda dosagem, seguindo-se o mesmo procedimento usado no experimento agudo.

- Índice de lesão ulcerativa (ILU):** determinado pela equação abaixo

$$\% \text{ de redução de ILU} = \frac{\text{média do controle negativo} - \text{média do grupo tratado com a amostra}}{\text{média do controle negativo}} \times 100$$

- Estimativa da dose efetiva para a redução de 50% do índice de lesões ulcerativas (DE50)** – Para se estimar a dose efetiva (DE50) que causa a redução de 50% do efeito ulcerogênico, uma curva dose-efeito foi determinada usando o experimento agudo e o modelo ulcerativo do etanol como já foi descrito. Os animais foram tratados com doses crescentes das proteínas (derivados de hidrolisado de colágeno de pele bovina ou suína ou IPSLB) como proteína única ou em mistura e efeito anti-ulcerativo. O valor DE50 foi obtido através de equações de regressão estabelecidas com base no tipo de curva experimental obtida (modelo ajustado).

Estudo dos possíveis mecanismos ou rotas de proteção às lesões ulcerativas

- Participação de substâncias sulfidrílicas** - a possível participação dos compostos SH na proteção da lesão ulcerativa do estômago causada pelo etanol foi determinada através de experimentos repetitivos. Seis grupos de cinco ratos (250-350g pc) ficaram em jejum por 24 horas. Imediatamente depois do período de jejum, cinco dos seis grupos receberam por aplicação subcutânea o NEM (10 mg/kg pc). Trinta minutos após a aplicação, o grupo que não recebeu o NEM, foi tratado com 10 mL salina/kg pc (controle negativo). Os cinco grupos restantes que receberam o NEM receberam também o tratamento seguinte. Após o primeiro tratamento, foi permitido aos ratos à ração comercial por 8 horas, seguido de um novo período de jejum de 16 horas, quando uma segunda série de tratamentos foi dada, de acordo com a primeira. Trinta minutos depois do segundo tratamento, todos os ratos foram incubados oralmente com 1,0 mL de etanol absoluto por animal. Uma hora após a administração do etanol, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos, lavados com salina e o corte aberto ao longo da curvatura maior para a determinação do índice de lesões ulcerativas.
- Participação da prostaglandina (PGE2)** - A inibição da síntese de PGE2 pela ação da indometacina (30 mg/kg pc) foi executada a fim de avaliar a importância do PGE2 e a sua participação na citoproteção da mucosa do estômago. O etanol foi usado como o agente ulcerogênico. Os agentes antiulcerogênicos testados são os mesmos dos experimentos precedentes com administração em doses repetidas (doses duplas). A concentração de PGE2 na mucosa gástrica foi determinada utilizando o Kit RPN nº 222 da Amersham Bio Sciences.
- Determinação de gastrina e somatostatina** – Determinação uma hora após a administração oro-gástrica do etanol, o sangue foi coletado da aorta abdominal ou do plexo ocular e foi armazenado em solução de EDTA (%). O sangue foi centrifugado 3000g por 15 minutos e o plasma obtido de cada amostra foi armazenado a -20°C até a determinação da gastrina e somatostatina. A determinação da gastrina no plasma dos animais utilizou um kit CIS Bio International de radioimuno ensaio. O limite residual da radioatividade nos tubos foi medido usando um cintilador com contador gamma, a cada minuto. Para o conteúdo de somatostatina no plasma foi usado o kit Eurodiagnostics Somatostatin de radioimuno ensaio. A radioatividade residual ligada foi medida nos tubos utilizando um cintilador para contagem de raios gamma, 2-4 minutos.
- Determinação do muco no estômago do rato** - Este método é baseado na determinação de mucopolissacarídeos solúveis usando o Alcian Blue (corante específico para as mucinas ácidas). O material a ser removido é um segmento glandular do estômago obtido dos ratos com as lesões gástricas induzidas pelo etanol. A leitura foi conduzida a 598nm após a elaboração de uma curva padrão com Alcian Blue.

Resultados

Índice de lesão ulcerativa da combinação do colágeno bovino e IPSLB em dose simples:

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	21	105.7±25.5	
Carboximetilcelulose	200	16	20.0±5.8 ***	81.0
BCH/ IPSLB	187/ 187	6	60.8±14.7***	42.5
BCH/ IPSLB	375/ 375	6	37.7±14.1***	64.4
BCH/ IPSLB	200/ 175	6	82.4± 17.5	22.0
BCH/ IPSLB	200/ 550	6	57.7± 17.9***	45.4
BCH/ IPSLB	200/ 800	6	39.0± 7.5***	63.1
BCH/ IPSLB	200/ 1300	6	47.0± 10.3***	55.5

Anova F (7,64) = 37.41; p<0.0001. Tukey's test, *p<0.05; ***p<0.001, referente a salina. (a) Dosagem da Salina 10 mL/ Kg pc.

Índice de lesão ulcerativa da combinação do colágeno suíno e IPSLB em dose simples

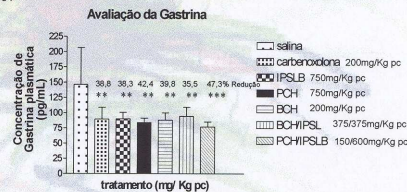
Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	21	105.7±25.5	
Carboximetilcelulose	200	16	20.0±5.8 ***	81.0
PCH/ IPSLB	187/ 187	6	72.8±37.0**	31.1
PCH/ IPSLB	375/ 375	6	46.3±16.6***	56.2
PCH/ IPSLB	150/ 600	6	44.8± 17.8***	57.6
PCH/ IPSLB	300/ 450	11	59.2± 21.6***	44.0
PCH/ IPSLB	450/ 300	6	55.0± 15.0***	47.9
PCH/ IPSLB	600/ 150	6	65.2± 28.2***	38.3

Anova F (7,89) = 21.78; p<0.0001. Tukey's test, *p<0.05; ***p<0.001, referente a salina. (a) Dosagem da salina 10 mL/ Kg pc.

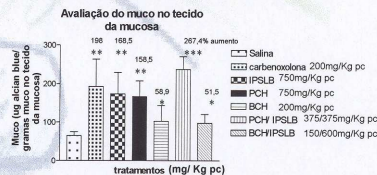
Índice de lesão ulcerativa de vários tratamentos (dose-dupla) do IPSLB e os colágenos bovino e suíno na redução de ILU em ratos

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	número de animais	ILU (média ± dp)	% Redução de ILU
Salina (a)	-	11	113.9±23.0	
Carboximetilcelulose	200	8	22.4±4.7 ***	80.4
BCH	200	6	64.5±20.5***	43.4
BCH	1500	5	25.8±10.8***	77.4
PCH	750	8	70.1± 17.3***	38.4
IPSLB	750	6	29.2± 16.1***	74.3
BCH/ IPSLB	375/ 375	6	27.2± 13.6***	76.1
PCH/ IPSLB	300/ 450	6	65.7± 19.4***	42.4

Anova F (7,42) = 28.00; p<0.0001. Tukey's test, *p<0.05; ***p<0.001 referente a salina. (a) Dosagem da Salina de 10 mL/ Kg pc.



Anova F (7,35) = 5.56; Dunnett test, *p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001, referente a salina.



Efeito protetor da mucosa gástrica de vários tratamentos do IPSLB e os colágenos bovino e suíno contra ILU causada pelo etanol em ratos

Intubação intragástrica	dosagem (mg/Kg pc)	ILU (média ± dp)	% Diminuição ILU (a) (b)
Salina (a)	-	120.5±30.3	(a)
Salina + NEM(b)	-	144.3±36.1	(b)
BCH	200	64.2±24.3**	46.7
BCH + NEM	200	135.3±24.9ns	12.3
BCH	1.500	63.2±7.2**	47.5
BCH + NEM	1.500	122.7± 38.9 ns	14.9
PCH	750	69.0±14.7**	42.7
PCH + NEMI	750	100.8±21.6*	30.1
IPSLB	750	45.2±9.9***	62.5
IPSLB + NEM	750	125.7±24.9 ns	12.9
IPSLB/ PCH	600/ 150	56.2±19.2***	53.4
IPSLB/ PCH + NEM	600/ 150	73.5±17.5***	49.0
IPSLB/ BCH	375/ 375	68.3±28.3***	43.3
IPSLB/ BCH + NEM	375/ 375	87.8±22.0**	39.1

Anova F (13,79) = 10.83; Tukey's test, *p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001, (a) referente a salina. (b) salina + NEM

Conclusão

• IPSLB e os colágenos BCH e PCH reduzem ILU de 40 a 77% dependendo da dosagem administrada oro-gástrica. A mistura BCH/ IPSLB na concentração de 375/ 375 mg/Kg pc reduziu 76% ILU.

• A produção de gastrina reduziu cerca de 40% e houve um aumento de muco de 50 a 267%.

• Os colágenos hidrolisados, bovino e suíno apresentaram forte efeito na produção de muco, por outro lado o efeito do IPSLB é mais dependente dos compostos sulfidrílicos, resultando importantes para a mucosa gástrica a mistura destas duas proteínas.

Referências

- Gamberine MT, Skorupa LA, Soucar C, Lapa AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1991; 86:137-9.
- Kontarek SJ. Mechanisms of gastroprotection. Scand J Gastroenterol. 1993; 174 (Suppl):15-28.
- Oates PJ, Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. Gastroenterol. 1988; 94:10-21.
- Rosaneli CF, Bighetti AE, Antônio MA, Carvalho JE, Sgarbi VC. Protective effect of bovine whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. J Med Food. 2004; 7:309-14.
- Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats. Biosci Biotechnol Biochem. 2001; 65:1104-11.
- Ushida Y, Shimokawa Y, Matsumoto H, Toida T, Hayasawa H. Effects of bovine alpha-lactalbumin on gastric defense mechanisms in native rats. Biosci Biotechnol Biochem. 2003; 67:577-83.

ANEXO IV



ANTIULCEROGENIC EFFECT OF ADMINISTRATION IN RATS OF A WHEY PROTEIN ISOLATE (WPI) AND COLLAGEN HYDROLYSATES, ALONE OR IN COMBINATIONS, AGAINST ETHANOL ULCERATIVE LESIONS.

Castro, G.A., Master Science in Food Technology and Doctor in Food in Nutrition of Food Engineering Faculty - Unicamp, zaragoa@fca.unicamp.br; Carvalho, J.E., Researcher CPQBA - Unicamp, carvalho@cpqba.unicamp.br; Sgarbieri, V.C., Professor of Food and Nutrition of Food Engineering Faculty - Unicamp, sgabier@fca.unicamp.br

GELITA
SOUTH AMERICA

Introduction

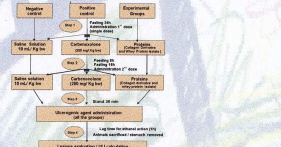
Isolated and combined samples of whey protein isolate (WPI), bovine (BCH) and porcine (PCH) collagens were evaluated in gastric ulcer model induced by ethanol. The mechanism of ulcerative lesion index reduction was evaluated in relation to mucus production, prostaglandin in mucosa, gastrin and somatostatin in plasma and aquisition of sulfidyls compounds by N-ethylmaleimide.

Objective

Evaluate the antilucerogenic effect of WPI and of bovine and porcine collagens in combination in gastric ulcer model induced by ethanol and its mechanism.

Methodology

WPI was obtained using fractionation with micro and ultrafiltration membranes. The bovine and porcine collagens were supplied by GELITA SOUTH AMERICA, Cota, SP, Brazil. The experimental protocol follows below:



- Acute Experiment:** Adult male Wistar rats were used, with 250 - 350g body weight. The animals were divided in groups of 5 - 6 animals, they were submitted to fasting of 24 hours, water *ad libitum* and then each group received by oro-gastric intubation the correspondent treatment.
- Double Dose Experiment:** The negative, positive and test groups were treated with physiologic saline solution, or antilucerogenic agent or with test proteins after 24 hours fasting, as acute experiment. After treatment with first dosage, the animals were fed for 8 hours using commercial ration, following with fasting with water *ad libitum* for 16 hours. After this procedure, the animals received the second dosage, following the same procedure used for acute experiment.
- Ulcerative lesion index (ULI):** determined by follow equation

$$\% \text{ ULI reduction} = \frac{\text{negative control mean} - \text{group treated with sample mean}}{\text{negative control mean}} \times 100$$
- The effective dose for 50% reduction of the ULI (ED50)** was calculated by using increasing single doses (200, 250, 750, 1000, 1500) mg sample per Kg rat body weight. The dose response relationship were fitted into a logarithmic equation which permitted the calculation of the ED50 for collagen hydrolysate and WPI.

Possible Mechanisms or protective routes for ulcerative lesions

- Importance of sulfidryl substances in the gastric mucosa protection** - Rats weighing 250-350 g were submitted to treatments by gastric intubation, according to the protocol of Figure 1. In this series of tests two controls were used: a) physiological saline at 10mL/Kg bw or b) saline (10 mL/Kg bw) plus 10 mg/Kg bw of N-ethylmaleimide (NEM). In both controls saline (a) was given by gastric intubation whereas NEM (b) was administered by subcutaneous injection. Half of the remaining groups (experimental) received only the testing samples whereas the other half received the testing samples plus NEM. The remaining of the procedures were identical with the protocol illustrated in Figure above.
- Gastrin determination** - According to proposed protocol Figure 1 (omitting step 2), one hour after ethanol administration, blood was collected from ocular plexus, treated with EDTA and centrifuged (5,000g, 15 min, 4°C) and the plasma was stored at -20°C until gastrin determination. Gastrin was determined in the rat blood plasma (21) using the radioimmuno assay kit supplied by CIS Bio International. Residual radioactivity bound to the tubes was measured in a gamma scintillation counter for 1 minute.
- Determination of mucus linked to the gastric mucosa** - One hour after administration of ethanol the mucus glandular region of the stomach mucosa was removed and immersed into 10mL of 0.1% alcian blue solution for 2 h, then washed (2x) with 10 mL 0.25M sucrose solution for 15 min and 45 min, respectively. The dye complexed with the gastric mucus was extracted (2 h) with 10 mL 0.5M MgCl₂ solution. The extracted material was emulsified with 10mL ethyl ether and then centrifuged (1,300g, 15 min, 4°C). The ether phase was discarded and the absorption of the aqueous phase was read in a spectrophotometer at 598 nm. Linked alcian blue was quantified (g dye/g original tissue) based in a dye standard curve.

Results

- Ulcerative lesion index of combination bovine collagen (BCH) and WPI at single dose:**

Intragastric intubation	dose (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean ± sd)	% ULI Reduction
Saline (a)	-	21	105.7±25.5	
Carbenoxolone	200	16	20.0±5.8 ***	81.0
BCH/WPI	187/ 187	6	60.8±14.7***	42.5
BCH/ WPI	375/ 375	6	37.7±14.1***	64.4
BCH/ WPI	200/ 175	6	82.4± 17.5*	22.0
BCH/ WPI	200/ 550	6	57.7± 17.9***	45.4
BCH/ WPI	200/ 800	6	39.0± 7.5***	63.1
BCH/ WPI	200/ 1300	6	47.0± 10.3***	55.5

Anova F (7,64) = 37.41; p***<0.0001. Tukey's test, *p<0.05, ***p<0.001, refers to saline.
(a) Saline dosage 10 mL/Kg bw.

- Ulcerative lesion index of combination of porcine collagen and WPI single dose**

Intragastric intubation	dose (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean ± sd)	% ULI Reduction
Saline (a)	-	21	105.7±25.5	
Carbenoxolone	200	16	20.0±5.8 ***	81.0
PCH/ WPI	187/ 187	6	72.8±37.0***	31.1
PCH/ WPI	375/ 375	6	46.3±16.6***	56.2
PCH/ WPI	150/ 600	6	44.8± 17.8***	57.6
PCH/ WPI	300/ 450	11	59.2± 21.6***	44.0
PCH/ WPI	450/ 300	6	55.0± 15.0***	47.9
PCH/ WPI	600/ 150	6	65.2± 28.2***	38.3

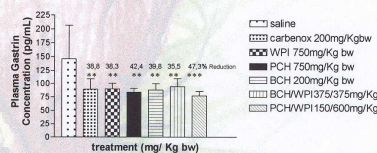
Anova F (7,69) = 21.78; p***<0.0001. Tukey's test, *p<0.05, ***p<0.001, refers to saline.
(a) Saline dosage 10 mL/Kg bw.

•Ulcerative lesion index of various treatments (double dose) of WPI and bovine and porcine collagens in ULI reduction of rats

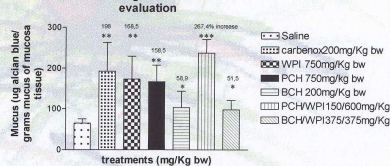
Intragastric intubation	dose (mg/Kg bw)	number of animals	ULI (mean ± sd)	% ULI Reduction
Saline (a)	-	11	113.9±23.0	
Carbenoxolone	200	8	22.4±4.7 ***	80.4
BCH	200	6	64.5±20.5***	43.4
BCH	1500	5	25.8±10.8***	77.4
PCH	750	8	70.1± 17.3***	38.4
WPI	750	6	29.2± 16.1***	74.3
BCH/ WPI	375/ 375	6	27.2± 13.6***	76.1
PCH/ WPI	300/ 450	6	65.7± 19.4***	42.4

Anova F (7,42) = 28.00; p***<0.0001. Tukey's test, *p<0.05, ***p<0.001 refers to saline. (a) Saline dosage 10 mL/Kg bw.

Gastrin Evaluation



Mucus of gastric mucosa evaluation



•Gastric mucosa protector effect of various treatments of WPI and bovine and porcine collagens against ULI caused by ethanol in rats.

Intragastric intubation	dose (mg/Kg bw)	ULI (mean ± sd)	% ULI Reduction
Saline (a)	-	120.5±30.3	
Saline + NEM(b)	-	144.3±36.1	(a) (b)
BCH	200	64.2±23.4**	46.7
BCH + NEM	200	135.3±24.9ns	12.3
BCH	1500	63.2±7.2**	47.5
BCH + NEM	1500	122.7± 38.9 ns	14.9
PCH	750	69.0±14.7**	42.7
PCH + NEM	750	100.8±21.6*	30.1
WPI	750	45.2±9.9***	62.5
WPI + NEM	750	125.7±24.9 ns	12.9
WPI/ PCH	600/ 150	55.2±19.2**	53.4
WPI/ PCH + NEM	600/ 150	73.5±17.5**	49.0
WPI/ BCH	375/ 375	68.3±28.3**	43.3
WPI/ BCH + NEM	375/ 375	87.8±22.0**	39.1

Anova F (13,79) = 10.83, Tukey's test, *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, (a) refers to saline.
(b) saline + NEM

Conclusion

- WPI and the collagens BCH and PCH reduce ULI from 40 to 77% depends on the oro-gastric administration. The mixture BCH/ WPI at 375/ 375 mg/Kg bw concentration reduced 76% ULI.
- The gastrin production reduced around 40% and mucus increased from 50 to 267%.
- The bovine and porcine collagens presented strong effect in mucus production, on the other hand, WPI is more dependent of sulfidryl compounds, resulting important the usage of the mixture of these two proteins.

References

- Gambarini MT, Skorupa LA, Soucar C, Lape AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1991; 86:137-9.
- Kontarek SJ. Mechanisms of gastroprotection. Scand J Gastroenterol. 1993; 174 (Suppl):15-28.
- Oates PJ, Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. Gastroenterol. 1988; 94:10-21.
- Rosaneli CF, Bighetti AE, Antônio MA, Carvalho JE, Sgarbieri VC. Protective effect of bovine whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. J Med Food. 2004; 7: 309-14.
- Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats. Biosci Biotechnol Biochem. 2001; 65:1104-11.
- Ushida Y, Shimokawa Y, Matsumoto H, Toida T, Hayasawa H. Effects of bovine α-lactalbumin on gastric defense mechanisms in native rats. Biosci Biotechnol Biochem. 2003; 67:377-83.



ANALYSIS OF CELL CYCLE PHASES AND OF PROLIFERATIVE CAPACITY IN MICE BEARING MELANOMA AND MAINTAINED ON DIFFERENT DIETARY PROTEINS

Castro, G.A., Master Science in Food Technology and Doctor in Food in Nutrition of Food Engineering Faculty- Unicamp, zerogoo@fea.unicamp.br; Maria, DA, Researcher Butantan Institute, duvane@usp.br; Sgarbieri, VC., Professor of Food and Nutrition of Food Engineering Faculty - Unicamp, sgarb@fea.unicamp.br

GELITA
SOUTH AMERICA

Introduction

The proliferate states can be unified in a single cell cycle model that recognizes differences in the behavior of rapidly dividing and slowly dividing cells in the same population. It has been suggested that the number of NORs may reflect nuclear and cellular activity. In this study is to evaluate the influence of dietary protein in the growth of melanoma B16F10 through analyses of tumor cell population in cell cycle phases and number of nucleolar organizer regions (NORs).

Objective

Evaluate the influence of dietary protein in the growth of melanoma B16F10 through analyses of tumor cell population in cell cycle phases and number of nucleolar organizer regions (NORs).

Methodology

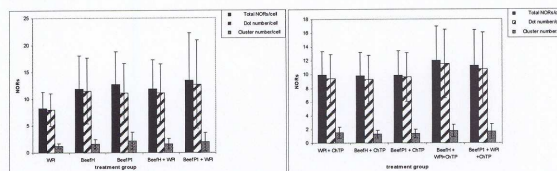
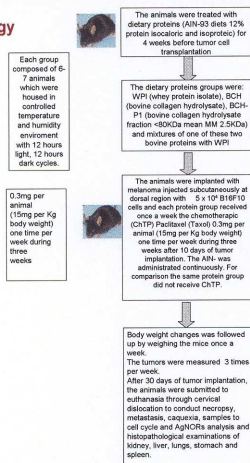


Figure 3 A, B. Measurement of silver-stained nucleoli from melanoma tumor cells removed from animals that received different protein diets without or with chemotherapeutic drug.

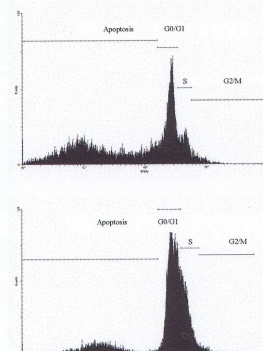


Figure 4 A, B. Histogram referred to cell cycle phases of BCH+WPI+ChTP (A) and BCH-P1+WPI+ChTP (B)

Determination of cell cycle phases. Flow cytometry was applied to study cell cycle, which permitted to determine the kinetic parameters of cell population and provide the percentage of cells that were in phases G0/G1, S, G2/M and apoptosis. Samples of tumor cells from animals treated with collagen and whey proteins and also non-treated sample were collected and frozen immediately in sodium citrate (2mM), sucrose 25 mM and 0.05% dimethylsulfoxide (DMSO), and stored in liquid nitrogen until the moment of use. After defrosting in ice bath the cells were incubated with 375 μ L of trypsin (Sigma) 0.03 g/L for 10 minutes at room temperature and neutralized using trypsin inhibitor (Sigma) 0.5 g/L, ribonuclease A (Sigma) 0.1 g/L and spermine (Sigma) 1.2 g/L. The samples were transferred to tubes of a flow cytometer and the cell counting at different cell cycle stage, apoptosis level (Sub-G1) and DNA content at S phase were obtained using Software Mod-fit (Becton-Dickson).

AgNORs technique. The procedure to conduct AgNORs technique requires the imprint of tumor tissue which was removed from animals treated with the collagen and whey proteins immediately after they were submitted to euthanasia. The imprint was emerged in acetone (p.a) for 5 minutes followed by washing with saline solution, then dried at room temperature. The imprinted material was stored at 4°C prior to staining. For staining it was necessary to emerge the imprinted material in a solution of colloidal silver prepared with one part of gelatin 2% dissolved in 1% formic acid mixed with two parts of silver nitrate solution (1:1). In the sequence the material was dried in a moisturized oven at 37°C for about 17-20 minutes. This time could be varied according to the tissue preparation procedure. Therefore, it is important to closely follow up the material during incubation at 37°C. After incubation, the material was washed with deionized water and sodium thiosulphate 1% for 1 minute at 37°C to complete the reaction. A second washing with water should be applied following the drying of the material at room temperature. During the procedure it is necessary to avoid exposure to light.

Results

Cell cycle phases

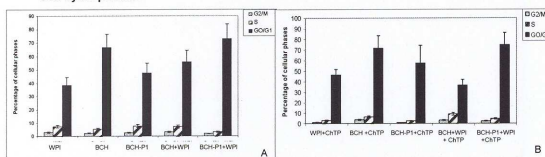


Figure 1A, B. Distribution of cell cycle phases in B16F10 melanoma after treatment with different protein diets without or with chemotherapeutic drug analyzed by flow cytometry.

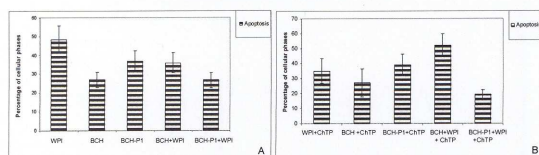


Figure 2A, B. Distribution of apoptosis cell cycle phase in B16F10 melanoma after treatment with different protein diets without or with chemotherapeutic drug analyzed by flow cytometry.

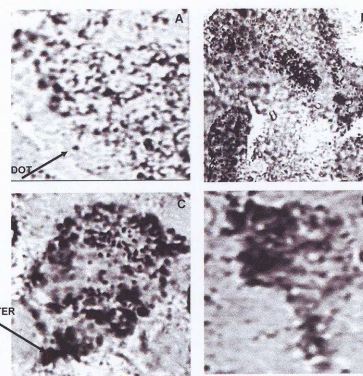


Figure 5 A, B, C, D. AgNOR's pictures of dietary protein groups without and with chemotherapeutic. A. BCH+WPI; B. BCH-P1+WPI; C. BCH+WPI+ChTP and D. BCH-P1+WPI+ChTP

Conclusion

Lesser proliferative capacity and maintaining at G0/G1 cell phase were better observed for dietary protein groups that were used two proteins BCH or BCH-P1 with WPI in a group with chemotherapeutic treatment.

References

- Sanjay A. Pai, Mie-Chi P. Cheung, Marvin M. Romsdahl, Asha S. Multani, Sen Pathak. Can Genetic Instability Be Studied at the Single Chromosome Level in Cancer Cells? Evidence from Human Melanoma Cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999, 109:51-57.
- Shackney SE, Shankey TV. Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions. *Cytometry* 1999, 35:97-116.
- M. Derenzini. The AgNORs. *Micron.* 2000, 31:117-120.
- Derenzini, M, Trerè D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chicco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol.* 2000, 191: 161-166.
- Evans AT, Orrell JM, Grant A. Re-evaluating silver-stained nucleolar regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: a study with quantitation and pattern analysis. *J Pathol.* 1991, 165:61-66.
- Howat AJ, Wright AL, Cotton DWK, Reeve S, Bleeher SS. AgNORs in benign dysplastic, and malignant melanocytic skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 1990, 12:156-162.
- Li LX, Crotty KA, Palmer AA. Argyrophilic staining of nucleolar organizer region count and morphometry in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003, 25:3-7.