RICARDO ALEXANDRE DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA, ANTITUMORAL E
HEMATOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA CASEÍNA INKKI E
YPVEPFTE NO MELANOMA EXPERIMENTAL**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**São Paulo
2009**

RICARDO ALEXANDRE DE AZEVEDO

**Avaliação da atividade proliferativa, antitumoral e hematológica dos
peptídeos derivados da caseína INKKI e YPVEPFTE no melanoma
experimental**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ivo Lebrun

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Azevedo, Ricardo Alexandre.

Avaliação da atividade proliferativa, antitumoral e hematológica dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE no melanoma experimental / Ricardo Alexandre Azevedo. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Ivo Lebrun.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Isolamento de peptídeos bioativos.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the activity proliferate antitumor and hematological of the peptides casein INKKI and YPVEPFTE in the experimental melanoma.

Descritores: 1. Peptídeos 2. Caseína 3. Atividade proliferativa 4. Migração celular 5. Atividade antitumoral I. Lebrun, Ivo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pos-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB23/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Ricardo Alexandre Azevedo.

Título da Dissertação: Avaliação da atividade proliferativa, antitumoral e hematológica dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE no melanoma experimental.

Orientador(a): Ivo Lebrun.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Certificado da Comissão de Ética

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Geração de peptídeos bioativos a partir de proteínas endógenas e caracterização de suas atividades biológicas e em culturas de células", protocolo nº **349/06**, sob a responsabilidade de Ivo Lebrun e Ricardo Alexandre de Azevedo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **12/12/2007**.

Vigência do Projeto: 12/2007 - 12/2009	Nº de Animais/Espécie
	75 / camundongo
	150 / rato

São Paulo, 19 de dezembro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dedico este trabalho a Deus, fonte inesgotável de vida e sabedoria.

Agradecimentos

A minha esposa Sheila Gil de Azevedo, por seu carinho, compreensão, presença e apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho;

Aos meus Pais e Irmãos pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida;

Ao Dr. Durvanei Augusto Maria que nos anos de convivência muito me ensinou, contribuindo de forma decisiva em meu crescimento científico e intelectual.

Ao Dr. Ivo Lebrun pela atenção e apoio durante o desenvolvimento do trabalho e orientação.

Aos amigos de laboratório Kleber, Rogério, Norma, Danilo, Fernanda, Kamila e Thiago pela colaboração na execução dos experimentos.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Resumo

AZEVEDO, R.A. **Avaliação da atividade proliferativa, antitumoral e hematológica dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE no melanoma experimental.** 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, 2009.

Os peptídeos INKKI e YPVQPFTE foram isolados a partir da hidrólise da β -caseína bovina e correspondem às seqüências 26-30 e 114-121 respectivamente. Trabalhos anteriores mostraram que estes peptídeos apresentaram atividade potenciadora da bradicinina, aumento da liberação de H_2O_2 por macrófago e aumento da capacidade fagocítica de macrófagos residentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade proliferativa, antitumoral e hematológica dos peptídeos da β -caseína bovina INKKI e YPVQPFTE no melanoma experimental. A atividade proliferativa foi avaliada em culturas primárias de linfócitos T, obtidas a partir dos gânglios linfáticos de camundongos BalB C fêmeas. A avaliação da migração celular foi realizada através da análise do exsudato inflamatório no dorso, bolha de ar com aproximadamente 2x4 cm, dos camundongos BalB C fêmeas. A atividade antitumoral "*in vitro*" foi realizada em culturas de melanoma murino B16F10. As avaliações dos efeitos citotóxicos e proliferativos foram realizadas pelo método colorimétrico MTT ("3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)2,5-diphenyl tetrazolium bromide"), com leitura de absorbância em aparelho de ELISA com comprimento de onda de 540nm, leitor Multiskan MS. Foram utilizado grupo com 40 camundongos da linhagem C57BL/6J para avaliar a atividade antitumoral "*in vivo*". Após o 4º dia do implante, os animais portadores de tumor foram tratados com os peptídeos INKKI, YPVEPFTE e solução salina (controle), pela via peri-tumoral, e foram avaliados os seguintes parâmetros: hemograma, ciclo celular das células tumorais, volume tumoral, área e número de metástases em órgãos internos. . A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student e análise de variância ANOVA pelo programa (Instat versão 2.0), aplicando o nível de significância $p \leq 0.05$. Nossos resultados mostraram que o peptídeo INKKI na concentração de 2 μ M apresentou resposta proliferativa semelhante ao mitógeno comercial PHA. O peptídeo YPVEPFTE mostrou ter ação proliferativa maior do que a apresentada pelo mitógeno comercial PHA na concentração de 1,2 μ M, enquanto que nas concentrações de 0,6 e 0,3 μ M apresentaram atividades semelhantes a do mitógeno comercial. O peptídeo INKKI na concentração de 2,0 μ M mostrou ação quimiotóxica no exsudato inflamatório. O tratamento "*in vitro*" mostrou que somente o pentapeptídeo INKKI nas concentrações de 2,0 a 0,03 μ M induz seletiva atividade citotóxica para as células de melanoma B16F10, com IC50% de 0,23 μ M. Os animais portadores de tumores dorsais de melanoma B16F10 apresentaram significativa redução das cargas tumorais, mostrando inibição da capacidade de crescimento e a metastatização. As avaliações hematológicas mostraram que os animais tratados com os peptídeos não desenvolveram anemia, redução no número de plaquetas e somente aqueles tratados com o YPVEPFTE aumento no número de leucócitos. Conclui-se que os peptídeos apresentam ação significativa tanto nos experimentos "*in vitro*" como "*in vivo*" sugerindo um possível papel fisiológico na prevenção de algumas patologias, como câncer e com vantagem de não induzir efeitos colaterais.

Palavra-chave: Peptídeos caseína; Atividade proliferativa; Migração celular; Atividade antitumoral.

Abstract

AZEVEDO, R.A. **Evaluation of the activity proliferative, antitumor and hematological of the peptides casein INKKI and YPVEPFTE in the experimental melanoma.** 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, 2009.

Peptides INKKI and YPVQPFTE were isolated from the bovine β -casein after hydrolysis corresponding to the 23-30 and 114-121 sequence, respectively. Previous works had shown that these peptides presented bradykinin-potentiating activity, increase of the release of H_2O_2 for macrophages and increase of the phagocytic capacity in resident macrophages. The aim of this work was to evaluate the activity proliferative, antitumor and hematological of the casein peptides INKKI and YPVEPFTE in the experimental melanoma. Evaluation of the proliferative activity in primary cultures of lymphocytes T obtained from lymphatic nodules from female Balb-C mice. The evaluation of the migration was accomplished through the analysis of the exsudato inflammatory in the dorsal, air bubble with approximately 2x4 cm, on the female Balb-C mice. The activity antitumor "*in vitro*" was accomplished culture of murino melanoma B16F10 was studied. The proliferative activity was evaluated by the method of reduction of the MTT ("3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide"), absorbance at 540nm was read on a Multiskan MS microplate reader. Groups with 40 C57BL/6J lines mice had been used to evaluate the antitumoral activity "*in vivo*". After 14^o day the tumor inoculation, the bearing animals of tumors had been dealt with peptides INKKI, Y PVEPFTE and saline solution by peri-tumor injection and had been evaluated the following parameters: blood count, cellular cycle of the tumor cells, tumor volume, area and number of metastases in internal agencies. The analysis statistics was carried through by test t of Student and analysis of variance ANOVA for the program (Instat version 2.0), applying the level of significance $p < 0.05$. Our results showed that peptide in the concentration of 2,0 μM presented similar proliferative response to the PHA commercial mitogen. The peptide YPVEPFTE showed to have proliferative action larger than presented by the commercial mitogen in the concentration 1,2 μM , while in the concentration 0,6 and 0,3 μM presented similar proliferative response to the PHA commercial mitogen. The peptide INKKI in the concentration 2,0 μM showed in the inflammatory exsudate chemotactic action. The treatment "*in vitro*" had shows that the peptide INKKI in the concentration 2,0 to 0,03 μM induces selective citotoxicity for the B16F10 cells melanoma with IC 50% of 0,23 μM . The bearing animals of dorsal tumors of melanoma B16F10 had presented significant reduction tumor load, showing to inhibition of the capacity of growth and the spread of methastasis. The hematological evaluation had shown that the treated animals with peptides didn't developed anemia, decrease in the platelet number and only those treated with YPVEPFTE peptide increased leucocyte number. Thus, the peptides casein present significant action in "*in vitro*" and "*in vivo*" experiments, suggesting a possible physiologic role in the prevention of some pathologies, as cancer and with advantage of non inducing side effects.

Keywords: Peptides casein; Proliferate activity; Cell migration; Antitumor activity

Lista de abreviaturas e siglas

AIF	Fator indutor de apoptose
Akt	gene humano homólogo ao oncogene viral v-akt, causador de leucemia em ratos. Sinônimo de PKB
ALCAM	Molécula de adesão celular ativadora de leucócitos
APAF-1	Fator de ativação da protease apoptótica
BALL	Linhagem celular de linfócitos B
b-FGF	Fator de crescimento fibroblasto básico
CDK	Quinase dependente de ciclina
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
E2F	Fator de transcrição
FADD	Domínio de morte celular ligado ao Fas
Fas	Família de receptor de morte celular
Fzd-5	Frizzled - 5
HGF/SF	Fator de crescimento hepatócito/fator de dispersão
HL-60	Linhagem celular leucêmica promielocítica aguda
HMB-45	anticorpo monoclonal que reage com a proteína gp100
HUT-78	Linhagem celular de linfócitos T
IAPs	Proteína inibidora de apoptose
ICAM-1	Molécula de adesão celular 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KDa	quilodalton
KHM-1B	Linhagem de células B

L1-CAM	Molécula de adesão celular L1
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MeICAM	Molécula de adesão celular do melanoma
MOLT-4	Linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda de células T
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase
PIP2	Fosfatoinositol-,4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatoinositol-3,4,5 bifosfato
PTEN	Fosfatase homóloga a Tensina
PKC	Proteína Quinase C
Ras	família denominada Ras – identificada em vírus que causam sarcomas em ratos
Rb	Retinoblastoma
RB1	Gene retionoblastoma
Ser (P)	Serina fosfato
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRADD	Domínio de morte celular ligado ao receptor TNF
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
U266B1	Linhagem de células B
U937	Linhagem de célula de linfoma histiocítico

VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μM	micromolar

Sumário

1 Introdução.....	13
1.1 Peptídeos bioativos.....	14
1.2 Peptídeos derivados do leite.....	14
1.3 Peptídeos biologicamente ativos da caseína.....	17
1.4 Câncer.....	19
1.5 Etiologia.....	19
1.6 Tumorigênese e Melanoma.....	20
1.7 Apoptose.....	33
1.8 Papel das proteínas do leite na tumorigênese.....	38
2 Objetivos.....	40
3 Materiais e Métodos.....	42
3.1 Animais.....	43
3.2 Ensaios “<i>in vitro</i>”.....	43
3.2.1 Cultura Primária de Linfócitos T de Camundongos Balb-c.....	43
3.2.2 Cultura Primária de Fibroblastos Humanos Normais.....	44
3.2.3 Cultura da Linhagem Tumoral de Melanoma Murino B16F10.....	44
3.2.4 Determinação da Atividade Citotóxica dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE pelo Método Colorimétrico MTT	45
3.3. Ensaios <i>in vivo</i>.....	45
3.3.1 Delineamento experimental.....	45
3.3.2 Avaliação da migração celular no tecido subcutâneo.....	46
3.3.3 Modelo experimental de melanoma murino.....	47
3.3.4 Implantação das Células Tumorais.....	48
3.3.5 Observação do crescimento tumoral.....	49
3.3.6 Análise das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.....	49
3.3.7 Determinação das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo.....	50
3.3.8 Contagem dos leucócitos totais, glóbulos vermelhos e plaquetas.....	51
3.3.9 Análises histopatológicas.....	51
3.3.9.1 Preparo das amostras para análise histopatológica.....	52

3.4 Análises estatísticas.....	52
4 Resultados.....	53
4.1 Avaliação da atividade proliferativa dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE em culturas primárias de linfócitos T	54
4.2 Avaliação do exsudato inflamatório.....	56
4.3 Avaliação da atividade citotóxica dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE nas células de melanoma B10F10.....	62
4.4 Avaliação da atividade citotóxica dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE em células de fibroblastos humanos normais.....	67
4.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	69
4.6 Análise macroscópica dos tumores do Melanoma B16F10 tratados com os peptídeos INKKI e YPVPFTE	75
4.7 Avaliação dos parâmetros histopatológicos.....	84
4.8 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos animais portadores de melanoma B16F10 tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPTE.....	94
5 Discussão.....	102
6 Conclusões.....	117
Referências Bibliográficas.....	119

1 Introdução

1.1 Peptídeos bioativos

Os produtos da digestão proteolítica de diversos alimentos e a degradação de macromoléculas endógenas, além de suprirem o organismo com aminoácidos essenciais e nitrogênio orgânico, são capazes de gerar vários peptídeos bioativos, os quais nessas últimas décadas vêm sendo estudados e caracterizados em diversos sistemas biológicos (SCHLINKE; MEISEL, 1995).

Esses peptídeos encontram-se na forma inativa dentro das cadeias polipeptídicas das proteínas originais, chamados de precursores peptídicos. Evidências indicam que os fragmentos peptídicos gerados após a hidrólise dessas macromoléculas, são capazes de atravessar o intestino delgado, atingir os tecidos periféricos, via circulação sistêmica, podendo apresentar ações específicas no trato gastrointestinal ou em sítios mais distantes, alterar o metabolismo celular ou ainda, atuar como vasorreguladores, fatores de crescimento, liberadores de hormônios ou neurotransmissores (ROBERTS; ZALOGA, 1994).

Os peptídeos podem ser obtidos através de proteínas adquiridas na alimentação, como no caso da caseína do leite, músculo de peixes, mamíferos e de proteínas vegetais (KITTS, 1994). Além da digestão, é possível a obter peptídeos bioativos pela proteólise de macromoléculas endógenas (RICHTER et al., 1999), de origem bacteriana, fungos e/ou através da ação de venenos animais, como de serpentes, vespas, anfíbios, entre outros.

1.2 Peptídeos derivados do leite

As proteínas do leite têm sido conhecidas pelo seu potente valor como alimentos funcionais e bebidas que confirmam os benefícios e cuidados com a saúde (FIAT et al., 1993). Essas proteínas são sintetizadas na glândula mamária na forma de precursores de alto peso molecular, sofrem modificações pós-transcricionais no complexo de Golgi e posteriormente são processadas por proteases e secretadas.

A caseína é uma mistura de fosfoproteínas, representando cerca de 80% do total de proteínas presentes no leite bovino, sendo secretada quase que exclusivamente na forma de grandes agregados dependentes de cálcio chamados de micelas e composta pelas cadeias polipeptídicas que variam de 19 a 25 kDa, sendo que as mais abundantes são a α_{s1} (com 119 aminoácidos), α_{s2} (com 207 aminoácidos), β (com 209 aminoácidos) e κ -caseína (com 169 aminoácidos) (MEISEL, 1997).

No leite humano a caseína representa somente de 30-36% do total de proteínas e subdivide-se em, β -caseína, κ -caseína e α_{s1} -caseína. A cadeia α_{s1} da caseína humana é homóloga em sua porção N-terminal quando comparada com as cadeias α_{s1} de outras espécies, como a bovina, de ovelha, de rato, de coelho, e de cabra. A β -caseína humana possui 47% de homologia com a β -caseína bovina (MEISEL, 1997).

A cadeia β é a mais abundante quantitativamente, e dependendo da forma de obtenção, ela pode ser desmembrada na cadeia γ , que corresponde ao fragmento 29-209 da cadeia β (LAHOV; REGELSON, 1996).

A β -caseína bovina é uma proteína de estruturas abertas, com 5 resíduos de fosfoserina localizados na porção N-terminal, peso molecular de 23 980 Da e predominância de estruturas primárias (randomizadas), o que se deve em parte, aos altos teores de prolina, distribuídas em toda cadeia polipeptídica (Figura 1). A β -caseína bovina apresenta tanto formação de estruturas em α -hélice quanto em folha β -pregueadas (Figura 2). São relativamente hidrofóbicas. Os resíduos hidrofóbicos, polares e carregados não se apresentam uniformemente distribuídos, sendo encontrado principalmente na porção C-terminal (resíduos 136-209) (KUMOSINSKI et al., 1993).

Algumas sequências dentro da cadeia polipeptídica apresentam importantes características funcionais. A presença de serina fosfato confere a molécula uma elevada afinidade por cátions bi ou trivalentes. Os cátions podem também encontrar-se ligados a grupamentos carboxílicos (ácido glutâmico e aspártico), grupamentos fenólicos (resíduos tirosil), grupamentos sulfidrílicos (resíduo cisteína) e grupamentos inidazólicos (resíduo histidil). Podem também adquirir propriedades funcionais diferenciadas quando associados aos minerais (GAUCHERON, 1997).

Zhang e Otani (2003) em um estudo com camundongos relataram que os anticorpos reconhecem as regiões fosforiladas da β -caseína bovina (Ser(P)- Ser(P)- Ser(P)) como epítomos intactos ou parte deles.

Figura 1 – Sequência da β -caseína bovina. O P sob o aminoácido S representa os resíduos de serina fosfato. Os peptídeos INKKI e YPVEPFTE estão localizados respectivamente, nos resíduos 26-30 e 114-121 (KUMOSINSKI et al., 1993).

Figura 2 – Representação inicial da estrutura secundária da β -caseína bovina. P indica os resíduos de prolina e SP indicam os resíduos de serino fosfato (KUMOSINSKI et al., 1993).

1.3 Peptídeos biologicamente ativos da caseína

Nos últimos anos diversos autores vêm descrevendo várias atividades biológicas atribuídas aos peptídeos gerados pela caseína. As atividades opiáceas como a tolerância, dependência, sedação, indução ao sono, depressão respiratória, bradicardia e hipotensão foram as primeiras a serem descritas. Todas essas atividades foram observadas com as β -casomorfina e morfictina, além do que altas concentrações desses peptídeos são encontradas em leite previamente digerido e no sangue de recém-nascidos, sendo capazes de diminuir o choro dos bebês e aumentar seu tempo de sono (FIAT; JOLLÈS, 1989).

Entre os peptídeos biologicamente ativos liberados a partir de fragmentos da caseína, um dos mais caracterizados é a caseína fosfopeptídeos. A caseína fosfopeptídeos pode formar complexos com o íon de cálcio e inibir a formação de precipitado entre o cálcio e fosfato (OTANI et al., 2001). O aumento da absorção de cálcio foi demonstrado em ratos cuja dieta rica em caseína leva a formação e acúmulo de caseína fosfopeptídes (OTANI et al., 2001). Este fosfopeptídeos em culturas de células esplênicas de camundongos demonstrou estimular a proliferação de linfócitos T e B e aumentou os níveis de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG (OTANI et al., 2001).

Em outro trabalho, Kawahara et al. (2004) mostraram que a sequência de aminoácidos β -caseína (1-28) exerce expressivo efeito mitogênico em linfócitos T linhagem de células HUT-78, Clone Jurkat E6-1 e MOLT-4, em linfócitos B das linhagens de células BALL, KHM-1B e U266B1 e em monócitos das linhagens de células U939 e HL-60. Nesse trabalho também ficou evidenciado o aumento dos níveis de IgA pela expressão intracelular de IL-6 em culturas de U266B1 e KHM-1B.

A partir da β -caseína bovina foi isolado o peptídeo YPVEP correspondendo a sequência de aminoácidos (114-118), o qual exerce uma atividade quimiotática em macrófagos e monócitos, aumentando os níveis de peroxidases responsáveis pela modulação da resposta imune inata, e por induzir a migração e ativação de macrófagos residentes (KITAZAWA et al., 2007).

Outros autores como Maruyama e Suzuki (1982) e Henriques et al. (1987) descreveram peptídeos com atividades anti-hipertensiva agindo como inibidores da

Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Esses inibidores podem também aumentar a atividade da bradicinina em várias preparações biológicas.

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan foram isolados, caracterizados e sintetizados os peptídeos INKKI e YPVEPFTE. O primeiro peptídeo corresponde ao fragmento 26-30 da cadeia β da caseína, localiza-se inserido dentro de uma estrutura β -pregeadas e próximo de uma região fosforilada com uma sequência de serina fosfato (Figura 2). Possui atividade potenciadora da bradicinina, aumento em até 80% a fagocitose dos macrófagos residentes peritoniais de camundongos e aumento na liberação de H_2O_2 por macrófagos (LEBRUN et al., 2004).

O peptídeo YPVEPFTE foi isolado e caracterizado a partir da hidrólise da cadeia γ -caseína, corresponde à seqüência de aminoácidos (114-121). Localiza-se em uma região linear, sem a presença de estruturas secundárias e com duas sequências de prolina (Figura 2). Apresenta uma importante atividade potenciadora de bradicinina por um mecanismo que não envolve a enzima conversora de bradicinina (LEBRUN et al., 1995).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é conhecidamente associada ao sistema renina-angiotensina, na regulação periférica da pressão sangüínea. A ECA aumenta a pressão do sangue através da conversão de angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor. Além disso, a ECA degrada o vasodilatador bradicinina e estimula a liberação de aldosterona no córtex adrenal. Dessa forma, a inibição da ECA tem efeito anti-hipertensivo. E pode influenciar diferentes sistemas regulatórios do organismo, como modulação da pressão sangüínea, defesa do sistema imune e atividades do sistema nervoso. Várias proteínas alimentares contêm peptídeos potencialmente capazes de inibir a ECA. E os peptídeos inibidores da ECA derivados da caseína representam diferentes fragmentos, que contêm em comum os aminoácidos como alanina, valina e prolina em sua estrutura, sugerindo que tenham importante papel neste efeito anti-hipertensivo (MEISEL, 1998).

1.4 O Câncer

O câncer é o nome dado a uma série de doenças que tem em comum o crescimento celular desordenado, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). A maioria dos cânceres origina-se de uma única célula mutada. Uma vez mutada as células dividem-se rapidamente se tornando muito agressivas e incontrolláveis, determinando a formação dos tumores ou neoplasias malignas (INCA 2008).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Sua classificação é dada de acordo com o tipo de célula normal que o originou e não de acordo com os tecidos para com os quais ele se espalhou, sendo essa a classificação primária.

As células tumorais apresentam características morfológicas que as diferenciam, possuindo o núcleo maior, mitocôndrias pouco funcionais, alterações ultraestruturais do citoesqueleto, variação na diferença de potencial transmembrana, maior produção de energia anaeróbica, entre outras (ALONSO et al., 2004).

1.5 Etiologia

A incidência de câncer, excluindo o de pele não melanoma, no Brasil representam taxas por 1/100.000 pessoas, mais acentuadas 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 e Alagoas (50 a 87 habitantes) [Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008)].

Nos últimos anos, vários avanços vêm sendo obtidos nas técnicas da área da biologia e metabolismo molecular e celular em cancerologia. As exposições aos agentes carcinógenos induzem a expressão de alguns marcadores moleculares e biológicos que está sendo avaliada na epidemiologia molecular, bem como no diagnóstico, tratamento e na avaliação clínica aplicada ao estudo. A resistência e a

suscetibilidade ao câncer variam de indivíduo para indivíduo, como o metabolismo individual aos compostos carcinogênicos, capacidade do reparo do DNA, alterações nos protooncogenes, genes supressores de tumor e fatores imunobiológicos (BRENTANI et al., 2003).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. Sumariamente, os fatores de riscos podem ser de natureza ambiental, ocupacional, medicamentos, hábitos sexuais, exposições a radiações ou de origem constitucional (moleculares, hereditários e suscetibilidade genética) (BRENTANI et al., 2003).

Estima-se que seja necessária a ocorrência de 4 a 6 alterações genéticas em diferentes genes para que ocorra o desenvolvimento de um tumor maligno (KOWALSKI et al., 2003; BRENTANI et al., 2003).

As mais notáveis alterações morfológicas que ocorrem no citoplasma de uma célula cancerosa envolvem o citoesqueleto. Enquanto uma célula normal contém organizada rede de microtúbulos, microfilamentos, e filamentos intermediários, o citoesqueleto da célula cancerosa é desorganizado e com redução na quantidade dessas organelas. Muitas mudanças morfológicas também são observadas na superfície da célula, incluindo o aparecimento (ou desaparecimento) de componentes específicos, como proteínas de superfície. Algumas células cancerosas possuem novas proteínas de superfícies, conhecidas por antígenos associados a tumores, que induzem a formação de anticorpos específicos contra as células (KROWN e CHAPMAN, 2004; WARD, 2000). Essas mudanças nas superfícies das células cancerosas alteram a sua adesão assim, a perda da adesão permite que as células cancerosas se destaquem da massa tumoral e migrem para outros tecidos e órgãos do corpo, cujo processo é conhecido por metástase (KROWN; CHAPMAN, 2004).

1.6 Tumorigenese e melanoma

Embora represente aproximadamente 4% dos cânceres de pele, o melanoma é responsável por aproximadamente 79% de morte por câncer de pele.

Oportunamente 95% dos casos de melanoma são curados se diagnosticado precocemente e retirado através de intervenção cirúrgica.

O melanoma origina-se a partir de melanócitos produtores de pigmento de melanina. No homem a pele a derme e a epiderme estão separadas por uma membrana basal e os melanócitos estão posicionados na junção epidermal. Um melanócito aparece a cada 10 células basais, aproximadamente, produzindo melanina, que é distribuída para as camadas superiores, dando cor à pele (em união com outros fatores) e protege o DNA contra a radiação ultravioleta (UV) (CUCÉ; FESTA-NETO, 2001). A melanina está envolvida pelo melanossomo prove proteção contra os efeitos danosos da luz ultravioleta Figura 3.

Figura 3 - Esquema representativo do epitélio pavimentoso estratificado queratinizado formado de cinco camadas celulares principais: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida (ao nível palmo-plantar) e camada córnea. Na lâmina basal estão os melanócitos, que produzem melanossomos que são distribuídos para as camadas superiores (MELISSOPOULOS; LEVACHER, 1998).

Apesar do envolvimento da dinâmica natural de protetor epidérmico no crescimento, diferenciação e migração vertical dos queratinócitos, a proliferação dos melanócitos está estritamente controlada e raramente observada em baixas

condições fisiológicas. Os melanócitos são diferenciados a partir dos melanoblastos, provenientes de células pluripotentes da crista neural (De VITA et al., 2005).

O desenvolvimento do melanoma é a maior consequência patológica de uma desregulação microambiental do mecanismo de controle gênico celular na diferenciação dos melanócitos. Dados epidemiológicos relatam quem a radiação UV, nas faixas de UVA e UVB como o maior fator ambiental para o desenvolvimento do melanoma (De VITA et al., 2005)..

O exato mecanismo pelo qual a irradiação UV induz o melanoma não está bem estabelecido. Diversas teorias da indução da carcinogênese pela irradiação UV tem sido proposta.

O principal alvo da mutagênese induzida pela ação da UV é a via do retinoblastoma (Rb). O gene retinoblastoma RB1, localizado no cromossomo 13q14, codifica a proteína Rb, proteína fundamental para a passagem da célula pelo ponto de restrição G1/S do ciclo celular. Uma disfunção no sinal do Rb pode levar à progressão prematura do ciclo, antes do reparo do DNA ser completado, deixando que as células se dividam geneticamente imperfeitas. A liberação do bloqueio de Rb depende da atividade do complexo molecular formado por quinase-dependente-de-ciclina (CDK4/6) e ciclina D4. Este complexo normalmente fosforila e inativa rb permitindo com que a replicação do DNA seja iniciada (HODGES, 2002).

O estudo realizado em um modelo de melanoma murino acionado pela ativação do H-Ras e perda da função da p19(ARF) exposto à irradiação UV, resultou em uma marcante aceleração da melanogênese em aproximadamente metade dos melanomas protegidos pela amplificação da quinase-dependente-de-ciclina (CDK)-6. Além disso, os melanomas induzidos pela UV mostraram um estreito relacionamento entre a amplificação da CDK-6 e a perda da p16 (KANNAN et al., 2003).

Outra possível via para a melanogênese através da irradiação UV é a via do HGF/SF (fator de crescimento hepatócito / fator de dispersão). Essa via é ativada através da ação conjunta da exposição à irradiação UV e uma sinalização aberrante de HGF/SF (NOONAN et al., 2001).

De uma forma geral, o melanoma é uma doença genética caracterizada por uma série de alterações acumulativa dos genes que modulam diversos

mecanismos relacionados à proliferação celular, morte celular programada, angiogênese e expressão de moléculas de adesão.

Estudos citogenéticos ajudaram a identificar que o locus 9p21 é responsável pela expressão das proteínas p16INK4A e p14ARF e que ambas as proteínas apresentam atividade supressora de tumor por duas distintas vias. A proteína primeira proteína age sobre a via do retinoblastoma (Rb) e a segunda tem ação sobre a via da p53 (SHERR; ROBERTS, 1995).

Inicialmente a p16INK4A foi identificada como uma proteína associada CDK4 capaz de inibir a fosforilação da proteína supressora de tumor Rb. Por causa da hipofosforilação, a Rb liga-se a E2F e suprime a atividade transcricional, fazendo com que a célula permaneça na fase G1. Portanto, as deleções na região 21 do braço curto do cromossoma 9 pode promover a perda da atividade supressora tumoral (POMERANTZ et al., 1998).

Há três proto-oncogenes da família ras: K-ras, N-ras e H-ras. Estes genes codificam proteínas ligadas ao grupo da guanosina trifosfato, conhecidas como p21ras, que são facilmente relacionadas e têm semelhança estrutural com a proteína G. Estas proteínas localizam-se no lado interno da membrana celular e participam do sinal de transdução. A função fisiológica da p21 é receber um sinal de um receptor de tirosina-quinase. Este permite a ligação de fatores de crescimento na face externa da membrana plasmática, levando, em última instância, a eventos que promovem a proliferação celular. A mutação deste gene, tornando-o um oncogene ativo, desencadeia a proliferação celular descontrolada (KUBRUSLY et al., 2002).

No melanoma a identificação da mutação no N-Ras foi encontrada em 5% a 15% em todos os casos esporádicos. Já no melanoma familiar, a incidência da mutação no gene N-Ras é de 95% (BALL et al., 1994)

O BRAF é um proto-oncogene localizado no cromossomo 7 (7q34), codifica uma proteína membro da família das proteínas-quinases serina/treonina. Estas proteínas são reguladoras via ras-raf-mek-erk e se ativam por mitógenos, fatores de crescimento e citocinas. Sua função é regular o crescimento, a sobrevivência e a diferenciação celular. Dados epidemiológicos mostram que a mutação de BRAF se encontra em nevos comuns, nevos displásicos e melanoma. Observou-se MAP-K ativada em 23% dos nevos comuns, 54% dos nevos atípicos / displásicos e 93% dos melanomas com mutação de BRAF. A mutação mais freqüente observada em

BRAF envolve a translocação de timina pela adenina na posição 1796 (T1796A) no éxon 15, o que leva à substituição do aminoácido valina para ácido glutâmico na posição 599 (V599E) da proteína. A troca do aminoácido ativa a proteína, pois propicia a fosforilação constitutiva dos aminoácidos adjacentes, conferindo capacidade oncogênica (GORDEN et al., 2003; DONG et al., 2003).

A ciclina D1 é uma proteína codificada pelo oncogene *CCN1* localizada no cromossomo 11q3. Foi observado aumento na proliferação em culturas celulares que não expressam ciclina D1. Por outro lado, a superexpressão de ciclina D1, com ou sem amplificação do gene, foi relatada em uma grande quantidade de tumores malignos (MOTOKURA; ARNALD, 1993).

A função desempenhada pela ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico do melanoma é discutido. Alguns trabalhos relatam que não há diferença entre a expressão da ciclina D1 entre os nevos e melanomas. Contudo, outros estudos mostram a superexpressão da ciclina no melanoma. A ciclina tem sido associada com o pior prognóstico nos melanomas da úvea, mas não foi encontrada a mesma correlação em tumores de outras localizações (RAMIRES et al., 2005).

A superexpressão da ciclina pode resultar na perda da função da Rb (retinoblastoma). Isto pode ocorrer através da fosforilação inadequada e conseqüente inativação da Rb (BAKER et al., 2005).

O gene *WNT5A* codifica uma família de glicoproteínas associado à adesão e motilidade celular presente em diversos tecidos normais e patológicos. Weeraratna et al. (2002) publicaram um importante estudo sobre as diversas variáveis relacionadas com o papel da *WNT5A* nas características fenotípicas do melanoma cutâneo e concluíram que o Frizzled 5 (Fzd-5), um receptor transmembrânicos com 7 (sete) passagens pela membrana, desempenham papel fundamental, à medida que houve um aumento de *WNT5A*, aumentou a capacidade de adesão e motilidade celular. Por outro lado, o uso de anticorpos para bloquear o Fzd-5, inibiu a atividade e invasão celular (IOZZO, EICHSTETTER e DANIELSON 1995).

Dependendo do tipo do sinal, o *WNT5A* pode sinalizar duas distintas vias de adesão e motilidade, denominadas de via regular e a outra de irregular. O sinal regular do *WNT5A* (exemplo *WNT-1* e *WNT-3*) ocorre através da ativação transcricional mediado pelo fator β -catenina/células T alvos do gene *WNT5A*. Já o sinal irregular é mediado pela ativação da fosfolipase c, proteína quinase c (PKC) e

quinase dependente de cálcio II. Portanto, a superexpressão do gene WNT5A pode contribuir de forma decisiva para a invasão local e à distância (BITTNER et al., 2000).

O gene PTEN (Fosfatase homóloga a tensina), também conhecido como MMAC1, é um gene de supressão tumoral, identificado no cromossomo 10q23.3, o locus do gene de susceptibilidade para a doença de Cowden. A doença de Cowden é de transmissão autossômica dominante e está associado ao desenvolvimento de câncer de mama, tireóide e com menor frequência, melanoma maligno (TSAO, 2003).

A proteína PTEN é constituída por 403 aminoácidos e faz parte da grande família de proteínas tirosina-fosfatase. Esta proteína é composta por dois principais domínios estruturais, o domínio C2 e o domínio fosfatase (JI-HYUN; CHARIS, 2005).

Evidências sugerem que o controle do PTEN via AKT desempenha um importante papel na modulação da degradação da P53 dependente de MDM2. O PTEN atua como supressor tumoral ao desfosforilar a posição 3 do fosfatidilinosítídeos, tal como ocorre com PIP3 (fosfatoinositol 3,4,5 trifosfato), onde a desfosforilação ocorre na posição 3 do inositol, produzindo PIP2 (fosfatoinositol 3,4 difosfato). O PIP2 e PIP3 foram encontrados tanto na membrana plasmática quanto na membrana celular (JI-HYUN; CHARIS, 2005).

O PIP3 localizado na membrana nuclear promove a sobrevivência celular por inibir a fosfoproteína nucleolar B23, o que sugere que o PTEN, tanto no núcleo como no citoplasma, pode atuar como regulador chave para a sobrevivência celular (JI-HYUN; CHARIS, 2005).

Guldborg et al. (1997) estudaram o padrão de deleção, mutação e expressão do gene PTEN através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em linhagens celulares de melanoma de 35 pacientes e observaram que nove (26%) destas linhagens apresentaram deleção homozigótica parcial ou completa do gene e outras seis linhagens (17%) apresentaram a mutação em combinação com a perda do segundo alelo. Esses achados sugerem que a perda ou mutação deste gene pode contribuir na patogênese ou evolução em uma grande proporção de melanomas malignos.

Em 1998 estudos realizados por Boni et al. examinaram o papel do PTEN em melanomas malignos esporádicos baseados na identificação da mutação deste

gene em tumores cerebrais, de mama e de próstata esporádicos. Os autores avaliaram amostras de 23 melanomas cutâneos primários e 17 metástases. As amostras provenientes de tecido previamente congelado foram microdissecadas e os marcadores D10S541 e D10S547 foram usados para detectar a perda de heterozigotidade no locus do gene PTEN. Nenhuma perda de heterozigotidade foi detectada utilizando-se esses marcadores, sugerindo-se que o PTEN não tem um papel na iniciação e progressão do melanoma (BONI et al., 1998).

Freqüentemente melanomas malignos apresentam perda de alelos no braço longo do cromossomo 10 e com o objetivo de identificar perda de alelos no cromossomo 10 bem como deleção e mutação do gene PTEN foi investigada uma série de 40 melanomas esporádicos de 37 pacientes, sendo 15 melanomas cutâneos primários e 25 metástases. A análise deste material revelou perda da heterozigotidade em loci localizados no cromossomo 10q em 15 de 34 pacientes (44%). Mutações somáticas do gene PTEN foram identificadas em 4 dos 37 pacientes (11%), todos com doença metastática. Os achados deste estudo corroboram que a perda da heterozigotidade no cromossomo 10 é uma aberração freqüente em melanomas malignos e sugerem que a inativação do gene de supressão tumoral PTEN através de mutações somáticas está presente em uma fração significativa desta neoplasia (REIFENBERGER, 2000).

Por fim, Goel et al. (2006) avaliaram a expressão imunoistoquímica do PTEN em 69 melanomas cutâneos primários e observaram perda ou redução da sua expressão em 19% dos tumores. Onze (85%) dos 13 casos que apresentaram expressão reduzida do PTEN, possuíam um índice de Breslow maior que 3,5 mm. Essa associação do aumento da espessura tumoral com a redução da expressão do PTEN foi, neste trabalho estatisticamente significativa.

As moléculas de adesão celular são importantes para o crescimento e metastatização do melanoma maligno. Moléculas de adesão são moléculas de superfície celular que se ligam especificamente a ligante de superfície de outra célula. Uma molécula de adesão pode se ligar a ela mesma (interação homofílica) ou a uma molécula de superfície celular diferente (interação heterofílica). As caderina são as principais moléculas de adesão encontradas nos desenvolvimentos tumorais. Muitas moléculas de adesão apresentam os dois tipos de interação. As moléculas de adesão podem mediar a adesão entre duas células do mesmo tipo

(adesão homotípica) e entre células de diferente origem (adesão heterotípica) (JOHNSON, 1999).

As caderinas são glicoproteínas transmembranárias contendo de 700 a 750 aminoácidos, sendo as principais moléculas de adesão celular responsáveis pela adesão célula-célula nos tecidos dos vertebrados. Formam uma superfamília como por exemplo Caderina E, Caderina P e Caderina N (JOHNSON, 1999). As caderinas pertencem a uma família de moléculas de adesão que medeiam interações celulares através de interações homofílicas cálcio-dependentes. Elas são expressas em todas as células que formam tecidos sólidos e são responsáveis não apenas pelo estabelecimento da arquitetura tecidual durante a organogênese, mas também pela sua manutenção nos organismos adultos. A E-caderina é essencial para a formação e manutenção do epitélio, ela é utilizada pelos melanócitos da epiderme para interagir com os queratinócitos vizinhos (RUITER; VAN MUIJEN, 1998).

O interesse em examinar a expressão da E-caderina em lesões melanocíticas surgiu através da descoberta de que os melanócitos expressam essa caderina e a usam como a principal molécula de adesão com os queratinócitos (TANG, 1994). Os melanócitos na pele são isolados uns dos outros, mas mantêm contato funcional e estrutural com os queratinócitos. Estudos *in vitro* mostram que o contato celular com os queratinócitos controla a proliferação e a diferenciação dos melanócitos. Na ausência deste contato, os melanócitos *in vitro* proliferam rapidamente e esta proliferação pode ser revertida pela adição de queratinócitos às culturas celulares (VALYI-NAGY et al., 1993). Os queratinócitos controlam o crescimento e a adesão intercelular dos melanócitos na epiderme, mas as células neoplásicas do melanoma são refratárias a este controle. A perda desta regulação pelos queratinócitos ocorre concomitante com a diminuição da expressão da E-caderina nas células do melanoma.

Mudanças na expressão de E-caderina são observadas já na fase de crescimento radial dos melanomas cutâneos, ou seja, na primeira etapa de seu desenvolvimento. A perda de função da E-caderina está relacionada com aumento da invasibilidade e metástase tumoral, o que pode ser interpretado como um evento importante na progressão desta neoplasia. Por outro lado, a medida que o melanoma inicia o processo de metastização, há um aumento na expressão de N-caderina em substituição à perda da E-caderina (RUITER e VAN MUIJEN, 1998;

JOHNSON, 1999). Portanto, o silenciamento e a expressão de E-caderina e N-caderina respectivamente, é um importante fator no desenvolvimento e progressão tumoral. Enquanto melanócitos normais expressam poucas moléculas receptoras de adesão celular, células de melanoma apresentam um aumento na expressão de: MCAM, Mel-CAM, MUC18 e CD146; molécula de adesão celular L1 (L1-CAM, CD171); molécula de adesão celular ativadora de leucócito (ALCAM, CD166); molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, CD106); molécula de adesão celular intercelular 1 (ICAM-1, CD54); molécula de adesão celular 1, relacionada com o antígeno embriogênico (CEACAM1, CD66a), (HAASS; SMALLEY, 2005).

As integrinas são de uma família de macromoléculas mediadoras da adesão celular e reguladora da angiogênese e da homeostasia vasculares. Fornecem interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, migração e posicionamento celulares e a indução de eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. As integrinas são uma família de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, consistindo de duas subunidades α com 150 a 180 KDa e β com aproximadamente 90 KDa, associadas não covalentemente. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (TUCKER, 2002).

As integrinas transmitem sinais para o interior da célula (chamada sinalização "de fora para dentro"), por meio dos domínios citoplasmáticos. Os domínios da subunidade β conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares como talina, vinculina e α -actinina (HAUBNER et al., 1997). Nesse processo, regulam a organização do citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras e modulam o ciclo celular. Algumas integrinas são expressas constitutivamente, ou seja, são produzidas normalmente pelo organismo em condições fisiológicas. Outras, entretanto, possuem regulação diferenciada e respondem a estados de ativação das células, por exemplo, por citocinas angiogênicas [VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), TGF- β (fator de crescimento tumoral β), b-FGF (fator de crescimento fibroblasto básico)] (XIONG et al., 2001). Esta regulação da atividade "de dentro para fora" protege o hospedeiro da adesão patológica mediada pela integrina. Tanto a sinalização "de fora para dentro" quanto à "de dentro para fora" estão associadas a alterações conformacionais distintas no segmento extracelular das integrinas. Estas mudanças

variam com o tipo e natureza do ligante e são moduladas por cátions bivalentes (XIONG et al., 2001). As moléculas de adesão celular não agem isoladamente. Pelo contrário, a função de adesão de uma molécula é modulada pela atividade de outra molécula de adesão. Assim, a modulação dessas moléculas é uma alternativa relevante no tratamento de tumores malignos, como o melanoma metastático.

O conceito de marcadores moleculares do melanoma está relacionado a fatores e/ou substâncias que podem identificar a presença ou a predisposição a esse determinado tipo de câncer. Esses marcadores podem estar associados a alterações em determinadas regiões genômicas, como mutações em genes de predisposição, por exemplo, como também podem estar relacionados à expressão de alguns antígenos em tumores e a presença de substâncias específicas na circulação sistêmica. A seguir serão apresentados os marcadores moleculares relacionados ao melanoma cutâneo dividido em marcadores gênicos e marcadores protéicos e imunohistoquímicos.

Como primeiro marcador gênico, o gene supressor de tumores CDKN2A (p16 INK4a) é encontrado no cromossomo 9 (SHARMA et al., 2002), na região p21 (braço curto); esta região está associada à perda de heterozigosidade (LOH), deleções ou mutações nos melanomas. O gene CDKN2A codifica a proteína p16, que inibe competitivamente CDK4 bloqueando a progressão do ciclo celular a partir da sua fase G1 (MANGINIET et al., 2002).

Estudos recentes em ratos, onde a proteína p16 foi mutada ou deletada, mostram um aumento na incidência de determinados tipos de câncer nesses animais, inclusive o melanoma (STRAUME et al., 2002). Relatam ainda que a perda da expressão da proteína p16 está relacionada ao aumento da proliferação de células tumorais na fase de crescimento vertical do melanoma cutâneo, o que indica perda de controle do ciclo celular; isso dá um suporte ainda maior ao conceito de que a proteína p16 é um importante regulador do ciclo celular nos melanomas (STRAUME et al., 2002).

O início do desenvolvimento do melanoma não está associado à proteína p16, porém a perda dessa proteína está associada a baixas taxas de sobrevivência dos indivíduos com a doença (POLSKY et al., 2001). Portanto, fica provada a grande importância da proteína p16 como marcador molecular no prognóstico do melanoma cutâneo (STRAUME et al., 2002).

O gene WAF1, localizado no cromossomo 6p, apresenta, freqüentemente, deleções em melanomas. A transcrição desse gene é comandada pelo gene p53, que codifica a proteína p21WAF1; esta proteína inibe a progressão do ciclo celular da fase G1 para a G2. Níveis elevados e reduzidos de p21WAF1 têm sido relatados na proliferação de células melanocíticas comparadas com melanócitos normais. Porém ainda são necessários mais estudos que determinem o significado da expressão da proteína p21WAF1 no melanoma (MANGINI et al., 2002).

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é um potente gene mitótico das células endoteliais que aumenta a permeabilidade vascular. Níveis de VEGF são elevados em condições inflamatórias e neoplásicas. A expressão do VEGF e do receptor de VEGF em células tumorais tem sido relatada em melanomas e em linhagens de células dos melanomas. Por isso, a positividade de VEGF pode ter um valor diagnóstico na identificação de lesões melanocíticas malignas (MANGINI et al., 2002).

Melanomas primários e metastáticos manifestam uma variedade de padrões morfológicos e arquitetônicos que imitam outros tumores e aumentam problemas de diagnóstico diferencial (BOYLE et al., 2002). Desta forma os marcadores protéicos e imunohistoquímicos vêm sendo considerados uma valiosa ferramenta no estudo e diagnóstico precoce do melanoma cutâneo.

A tirosinase é a principal enzima na síntese de melanina, pois catalisa os dois passos iniciais da biossíntese desse pigmento; síntese da tirosinase ocorre dentro de organelas altamente especializadas chamadas melanossomos (SHARMA et al., 2002). O HBM-45 é um anticorpo monoclonal que reage com uma proteína (chamada gp100) que está localizada dentro dos melanossomos (BOYLE et al., 2002). Tanto o HMB-45 como os anticorpos contra tirosinase são usados como marcadores imunohistoquímicos no diagnóstico diferencial do melanoma maligno (SHARMA et al., 2002). Em estudos realizados por Boyle et al. (2002) foi detectada a presença de Tirosinase em todos os melanomas estudados; também foi detectado, por esses estudos, que a reatividade para o anticorpo HMB-45 está presente em 100% dos melanomas. Outros estudos anteriores, porém, apontaram menor imunorreatividade para os anticorpos HMB-45 e Tirosinase.

A molécula de adesão celular do melanoma (Mel-CAM), um membro da superfamília das imunoglobulinas, é um antígeno de melanoma associado com um aumento do risco de doença metastática. Mel-CAM não se expressa em

melanócitos normais, mas se expressa por nevos benignos, células de melanoma e outros tipos celulares. A interação entre Mel-CAM e seus receptores pode induzir outros sinais celulares necessários para a progressão do tumor (MANGINI et al., 2002).

As moléculas de adesão celular do melanoma não são específicas para melanomas. Angiosarcomas, sarcoma Kaposi, leiomiosarcomas, carcinomas mucoepidermóides, tumores trofoblásticos placentários e oriocarcinomas também expressam Mel-CAM (MANGINI et al., 2002). O diagnóstico usando Mel-CAM é mais eficaz quando ele é usado em um painel de marcadores para aumentar a especificidade. As moléculas de adesão celular do melanoma não são úteis na distinção de lesões melanocíticas benignas versus malignas (MANGINI et al., 2002).

Os mecanismos pelos quais os melanócitos tornam-se malignos "*in vivo*" ainda são pouco conhecidos; no entanto, a ativação e inativação de oncogenes dominantes e recessivos estão envolvidas no processo tumoral. Sabe-se que as células neoplásicas apresentam profunda anormalidade quando interagem com seu micro ambiente, as transformações malignas são provavelmente também alterações gênicas que codificam fatores de crescimento e/ou seus receptores, o que confere autonomia de sinais proliferativos positivos, independente do meio extracelular (BRODLAND, 1997).

Os melanócitos são células dendríticas originárias da crista neural, que migram durante o desenvolvimento embrionário para a epiderme e cuja principal função é a síntese e transferência dos grânulos de melanina para os queratinócitos circunvizinhos (SLOMINSKI et al., 1995). Em parte, é o tipo de grânulo de melanina sintetizado pelo melanócito, o qual pode ser composto por eumelanina (pigmento de coloração marrom ou preto), feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho) ou uma mistura de ambos, que irá determinar a coloração da pele. A quantidade de melanócitos presentes na epiderme varia segundo a região anatômica, sendo cabeça e antebraço as regiões com maior densidade dessas células (ELWOOD; GALLAGHER, 1998). Estímulos externos tais como a radiação ultravioleta, podem induzir à proliferação dos melanócitos. Em indivíduos expostos à radiação solar, observa-se um aumento da sua quantidade em regiões do corpo mais expostas (CASTANET; ORTONNE, 1997).

As mudanças proliferativas nos melanócitos, de acordo com Slominski, et al. (1995) são:

- 2 - nevo displásico;
- 3 - melanoma de crescimento radial;
- 4 - melanoma de crescimento vertical;
- 5 - melanoma metastático.

Tanto o nevo melanocítico benigno quanto o displásico são considerados marcadores para o melanoma, e sua presença aumenta o risco de desenvolvê-lo (SLOMINSKI et al., 1995; ELLISON et al., 1987; CASTANET e ORTONNE, 1997; ELDER, 1999). Considera-se o nevo displásico como uma lesão precursora do melanoma (BALCH et al., 2001).

O melanoma corresponde ao estágio final da carcinogênese melanocítica, no qual a instabilidade genética das células iniciadas leva a um aumento da sua capacidade proliferativa e de invasão (BALCH et al., 2001). Seu processo de progressão aumenta em agressividade, passando pelas fases de crescimento radial, vertical e no final, a metastática (ELDER, 1999).

O melanoma cutâneo é classificado em quatro grupos clínico-histológicos:

- 1 - melanoma em lentigo maligno;
- 2 - melanoma disseminativo superficial;
- 3 - melanoma nodular;
- 4 - melanoma acral lentiginoso.

O primeiro subtipo corresponde a 5% dos melanomas em caucasianos, e é mais freqüentemente diagnosticado em mulheres, indivíduos com idade superior a 60 anos e em áreas anatômicas mais intensamente expostas ao sol. O subtipo mais comum em indivíduos de pele clara é o disseminativo superficial, correspondendo a 70% dos melanomas diagnosticados. A localização anatômica predominante varia em função da idade, ocorrendo nos indivíduos mais jovens em áreas menos expostas ao sol (costas, braços, ombro, perna e coxa) e entre os mais velhos nas mais expostas (cabeça e pescoço) (ELWOOD; GALLAGHER, 1998). O subtipo nodular é o segundo mais comum entre caucasianos, e corresponde entre 10 - 12% dos melanomas diagnosticados (INCA, 2008). Similarmente ao disseminativo superficial, a sua distribuição anatômica varia com a idade (ELWOOD; GALLAGHER, 1998). O subtipo mais raro é o melanoma acral lentiginoso (ELDER, 1999). Esse é mais comum entre negros e as áreas anatômicas predominantes são

as palmas, solas e leito ungueal (ELWOOD e GALLAGHER, 1998; COLEMAN et al., 1980).

O prognóstico para melanoma é melhor para os subtipos; lentigo maligno e disseminativo superficial. O pior prognóstico está associado à idade superior a 60 anos, gênero masculino, lesões localizadas no tronco, tumores de maior espessura, e padrão sócio econômico mais baixo (GRICHNIK et al., 1998; MACKIE e HOLE, 1996; SLOMINSKI, 1995).

1.7 Apoptose

A morte celular ou o processo de morte celular são comuns em tecidos. A morte celular isoladas em tecidos normais pode ser característica durante a renovação celular, como parte do desenvolvimento embrionário normal, como parte de modificações cíclicas em tecidos e órgãos ou ainda em condições patológicas. O termo apoptose é aplicado a todos os exemplos de morte de uma célula isolada, uma vez que embora ocorram em resposta a um amplo conjunto de disparadores, parece ser um mecanismo comum de morte celular e com aspectos microscópicos característicos (LEIST; NICOTERA, 1997).

A necrose difere da apoptose por ser de origem patológica, acompanhada de reação inflamatória e caracterizada pela inabilidade das células em produzir ATP necessário para manter a homeostasia tissular (LEIST; NICOTERA, 1997).

Por ser um processo ativo, a apoptose necessita de um gasto energético. Quando ocorre durante o processo embrionário, é chamada de morte celular programada, destacando seu caráter inevitável e controle genético (LEIST; NICOTERA, 1997).

A apoptose pode ser disparada pela ligação de uma molécula sinalizadora a um receptor de membrana, ou a falta de um sinal particular necessário para bloqueá-la. No núcleo celular, alguns produtos gênicos inibem (Bcl-2) ou estimulam (p53) o processo, conforme suas inter-relações e influências de outros reguladores (LEIST; NICOTERA, 1997).

Depois de iniciar o processo de apoptose, algumas modificações são visíveis ao microscópio ótico, tais como a condensação da cromatina nuclear

(núcleo picnótico), formando uma ou mais massas escuras justapostas à membrana nuclear. Ao mesmo tempo as células afastam-se de suas vizinhas pela perda dos dispositivos de aderência, e o aumento da eosinofilia do citoplasma. Nesta fase as organelas citoplasmáticas ainda estão preservadas. Em seguida o material nuclear se fragmenta (cariorréxis), acompanhada da dissolução da membrana nuclear. Vesículas citoplasmáticas se destacam da superfície celular e toda a célula pode vir a fragmentar-se (cariólise), originando fragmentos envolvidos por uma membrana, algumas dos quais contendo material nuclear (corpúsculo apoptóticos), podendo ser fagocitados por macrófagos ou células vizinhas (YOUNG; HEATH, 2001).

O diagnóstico de apoptose pode ser feito baseado em fatores morfológicos, através de cortes histológicos tais como fragmentação nuclear, métodos imunohistoquímicos e também funcionais como o aumento da permeabilidade da membrana (MAJNO; JORIS 1996),

Flemming (1885) observou as primeiras alterações celulares com características de apoptose em folículos ovarianos em regressão (BONINI, 2000). A descoberta do fenômeno foi realizada por Car Vogt em 1942 (PETER et al., 1997). Em 1964 o termo morte celular foi introduzido por Lockshin propondo que a morte celular durante o desenvolvimento não ocorre por acidente, mas segue uma seqüência de eventos controlados levando a autodestruição (GEWIES; GRIMM, 2003). Kerr et al. (1972) foram os primeiros a propor o termo apoptose para descrever os processos fisiológicos que levam a autodestruição celular controlada.

Os sinais mais evidentes encontrados em morte celular por apoptose envolvem a condensação e marginalização da cromatina com enrugamento da membrana plasmática. Eventualmente as células dividem-se em corpúsculos apoptóticos que consistem em organelas celulares e/ou material nuclear, envolvidos por uma membrana plasmática intacta, os quais serão fagocitados por células vizinhas ou, principalmente por macrófagos, através do reconhecimento dos fragmentos celulares pela expressão da fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática destas células (FADOK et al., 1992).

Morfológicamente, o reconhecimento da célula apoptótica depende principalmente da observação de corpúsculos apoptóticos. A maioria deles é de formato circular ou oval. Os menores são de difíceis acessos, a não ser que contenham uma pequena mancha de cromatina condensada em seu interior. A segregação desta cromatina que é vista em fragmentos apoptóticos nucleares na

microscopia eletrônica só pode ser evidenciada sob microscopia de luz em cortes de tecidos mais finos. Esses corpúsculos que derivam de células com uma alta proporção nuclear, no citoplasma normalmente compreendem massas únicas de cromatina picnóticas margeadas por citoplasma. Quando a célula apoptótica apresenta um grande citoplasma, a maioria dos corpúsculos contém apenas pequenas manchas de cromatina picnótica e alguns são desprovidos de componentes nucleares (KERR et al., 1995).

Resumidamente, as modificações nucleares típicas que ocorrem na apoptose associadas a um tipo definido de quebra de DNA, podem ser divididas nas seguintes etapas: 1. a célula encolhe e seu citoplasma torna-se denso; 2. a cromatina agrega-se formando densas massas bem definidas de encontro à membrana nuclear; 3. o núcleo pode, eventualmente, fragmenta-se (criorréxis); 4. as células emitem protrusões que tendem a quebrar-se, dando origem à pequenos corpúsculos apoptóticos, eosinofílicos, contendo ou não fragmentos nucleares; 5. macrófagos ou células vizinhas fagocitam os debris; e por fim 6. clivagem do DNA. Esse processo é dinâmico, sendo realizado em poucas horas (MAJNO; JORIS, 1996).

É importante entender os diferentes tipos de morte celular existente, principalmente a necrose. A morte celular causada por necrose é caracterizada por ocorrer em grupos celulares, pelo aumento do volume celular e perda da integridade das membranas plasmáticas e das organelas, seguida de uma desorganização citoplasmática e dissolução nuclear. Outra importante característica de uma morte celular causada por necrose é que as células injuriadas liberam seus conteúdos citossólicos no espaço extracelular, havendo produção de exsudato celular, inflamação e edema. Essas características não são encontradas em células mortas por apoptose, pois, seu material celular envolvidos por uma membrana são fagocitados por células vizinhas ou macrófagos não apresentando quadro inflamatório (MAJNO; JORIS, 1996).

O mecanismo da apoptose pode ser disparado por alguns fatores tais como através dos receptores de morte, por injúrias capazes de danificar o DNA como irradiações X e ultravioletas, por quimioterápicos e toxinas. Proteínas sensíveis aos danos causados ao DNA ajudam a disparar o mecanismo. Essas também atingem o ciclo celular, parando a divisão celular para que o dano seja reparado ou decidido pela morte celular (Van CRUCHTEN; Van BROECK, 2002).

Os mecanismos envolvidos no processo de apoptose podem ser mediados por um receptor ligante, por uma via mitocondrial e um último no qual o retículo endoplasmático assume papel central. Todos esses três mecanismos ativam caspases, que são responsáveis pelas modificações morfológicas observadas durante a apoptose (Van CRUCHTEN; Van BROECK, 2002).

Existem moléculas que se ligam a receptores específicos na superfície celular e sinalizam a célula para que se inicie o programa de apoptose. Esses ativadores de morte incluem o TNF- α (fator de necrose tumoral α), ligando-se a receptores TNF- α , o TNF- β , uma linfotóxina que também se liga ao receptor TNF, FasL, ou ligante Fas, uma molécula que se liga ao receptor Fas, também denominado de CD95. O Fas é um membro da família dos receptores de TNF e seu ligante é uma citocina associada à membrana de TNF (LEHNINGER, 2002).

Os mecanismos pelos quais as células entram em apoptose podem ser gerados por sinais que chegam ao interior da célula, disparados pelos ativadores da morte que se ligam a receptores na superfície celular (TNF- α , linfotóxina TNF- β e FasL) ou acionados por espécies reativas do oxigênio (radicais livres). Os mecanismos regulatórios envolvem algumas das mesmas proteínas que controlam o ciclo celular e o sinal para a morte, na maioria, vem do exterior, por intermédio destes receptores de superfície (LEHNINGER, 2002).

Esses receptores pertencem a uma superfamília de genes TNF, definida por semelhantes domínios extracelulares ricos em cisteínas. Esse domínio possui cerca de 80 resíduos de aminoácidos, que passa o sinal de autodestruição através da membrana plasmática às proteínas citosólicas como o TRADD (domínio da morte associado ao receptor TNF). Outro receptor, o Fas, possui um domínio de morte semelhante que interage com a proteína citosólica FADD (domínio de morte associado ao Fas), ativando uma protease citosólica denominada de caspase-8. As porções citoplasmáticas desses receptores compartilham um domínio de morte, que promove a interação proteína-proteína. As proteínas adaptadoras que interagem com os domínios de morte nas caudas citoplasmáticas do Fas e TNFR-1, são denominadas de FADD e TRADD, respectivamente, as quais interagem por meio de diferentes regiões com a caspase-8, cujo domínio carboxi-terminal é uma pró-caspase (forma inativa da caspase) (JANEWAY, 2000). Quando a pró-caspase-8 é ativada, ela dispara a cascata das proteases, ou seja, ao serem ativadas pelos

respectivos receptores, as proteínas estimulam uma família de proteases citosólicas denominadas de caspases, também chamadas pela sigla ICE (JANEWAY, 2000).

Portanto, as caspases ativadas clivam e inativam uma sequência de caspases, ativando no final dessa via uma DNase que entra no núcleo e cliva o DNA, produzindo fragmentos característicos de uma célula em apoptose (JANEWAY, 2000).

O estresse celular causado por fatores como radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimentos, poucos nutrientes, excesso de espécie reativas de oxigênio e corticosteróides podem ativar uma via independente dos receptores de morte celular. Essa via pode ser disparada por sinais internos denominada de via mitocondrial ou via intrínseca. Tais sinais são reconhecidos pelas mitocôndrias, centro de decisões sobre a vida e morte celular. Se esses sinais conduzirem para a morte, as mitocôndrias sofrerão um desacoplamento da cadeia respiratória e será liberado para o citosol o citocromo c e proteínas SMAC/DIABLO e AIF (Fator indutor de apoptose). O citocromo c citoplasmático liga-se à APAF-1 (molécula homóloga ao Ced-4) e na presença de ATP, ativam a caspase 9, a qual irá ativar a caspase 3. O complexo construído por citocromo c, APAF-1, ATP e caspase-9 é denominado de apoptossomo executor. A proteína SMAC, por sua vez, é responsável pela inativação da ação negativa das IAPs (proteínas inibidoras de apoptoses) sobre a apoptose (CORNELIS et al., 2007).

A liberação do citocromo c a nível mitocondrial é controlado principalmente pelas proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bax), onde existem membros homólogos ao gene egl-1 (pró-apoptótico) e ao gene Ced-9 (anti-apoptótico), exercendo regulação mútua (CORNELIS et al., 2007).

Ao ligar-se a uma molécula da proteína Apaf-1 (fator de ativação da protease apoptótica) a Bcl-2 ativa a procaspase-9 no citocromo c. Quando a Bcl-2 libera Apaf-1, decorrente de um dano celular interno, uma proteína relacionada, Bax, penetra nas membranas mitocondriais promovendo o extravasamento do citocromo c, que ao ser liberado, vai ligar-se, juntamente com a Apaf-1 à moléculas da caspase-9 e ATP denominado de apoptossomo (CORNELIS et al., 2007).

Existe ainda uma terceira via de morte por apoptose que não utiliza das caspases e envolve a proteína AIF (fator indutor de apoptose). Normalmente a proteína AIF situa-se no espaço intermembranoso da mitocôndria. Quando da

sinalização negativa, este fator é liberado da mitocôndria (semelhante na liberação do citocromo c da via intrínseca), vai ao núcleo e liga-se ao DNA, ativando sua destruição e a morte celular (CORNELIS et al., 2007).

Por fim, proteínas pró-apoptóticas como o Bax, cujo alvo é a membrana mitocondrial, podem induzir dano e apoptose mesmo quando as caspases estão inativas (CORNELIS et al., 2007), sugerindo que há um mecanismo caspase-independente para a morte celular programada e envolvendo a mitocôndria.

1.8 Papel das proteínas do leite na tumorigênese

Como já visto, a caseína representa aproximadamente 80% das proteínas do leite (HAWRYLEWICZ et al., 2001). Alguns estudos realizados “*in vivo*” vêm comparando os produtos intermediários do metabolismo encontrados como imunomoduladores em animais cuja dieta é rica em proteínas do leite, trigo, carne e soja. O primeiro estudo mostrou que camundongos alimentados com 20% a mais com caseína apresentaram menor incidência de tumores de cólon induzidos por dimetillidrazine (DMH), em comparação aos camundongos alimentados com proteínas de trigo e soja (PARODI, 2007).

A dieta de proteína de origem animal produz mais pólipos intestinais do que a dieta a base de caseína (MUTANEN et al., 2000). Este modelo experimental tem uma mutação germinativa no gene (APC) que desenvolvem adenoma no do trato intestinal. Em humanos a mutação no gene reparo APC inicia o desenvolvimento de muitos tumores de cólon (MUTANEN et al., 2000).

Elevando-se a temperatura da caseína para 130 °C em até 20 min, ela não perde a capacidade antimutagênica, mas, essa capacidade pode ser aumentada, após a hidrólise com pepsina, uma vez que simula as condições estomacais (HOSONO et al., 1988).

Estudo mostrou que a ação das proteínas do leite e seus peptídeos na inibição do desenvolvimento do tumor estão associados com a ativação da função do sistema imunológico, tais como a proliferação de linfócitos T, ativação policlonal de leucócitos, aumento das atividades das células matadoras naturais (NK), e o aumento da população de linfócito T citotóxico CD4⁺/CD8⁺ (LeBLANC et al., 2002).

Portanto, com o aumento das indústrias de alimentos na busca da agregação de valores nutricionais e fisiológicos aos seus produtos, os peptídeos obtidos pela hidrólise da caseína devem ser estudados e caracterizados.

2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos antitumorais e antiproliferativos dos peptídeos derivados da caseína INKKI e YPVEPFTE em linhagens de células tumorais de Melanoma B16F10, e células normais linfócitos T e fibroblastos humanos. Avaliar *"in vivo"* os aspectos na inibição do crescimento e disseminação das células tumorais em animais portadores de melanoma dorsal B16F10, tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE, como também as modificações na distribuição das populações de células tumorais nas fases do ciclo celular e as alterações hematológicas, durante o tratamento.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens Balb-c e C57BL/6J, do Biotério Central e do Biotério da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan, com aproximadamente 25 g, idade aproximada de 6 a 8 semana, mantidos com água, ração e acondicionados no biotério do Laboratório de Bioquímica e Biofísica em gaiolas com capacidades para 20 animais. Os protocolos empregados no desenvolvimento deste trabalho foram submetidos e aprovados pela comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

3.2 Ensaios *in vitro*

3.2.1 Cultura Primária de Linfócitos T de Camundongos Balb-c

Os linfócitos totais foram obtidos dos gânglios popliteais de camundongos da linhagem balb-c, após o sacrifício por deslocamento cervical. A suspensão celular obtida foi incubada 37 °C a 5% CO₂ por 3 horas em placa de Petri P-35mm contendo 3 mL de soro fetal bovino, após este período as células não aderentes foram recolhidas, centrifugadas e ajustado a concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL. As culturas foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementados com soro fetal bovino, acrescido de antibióticos e incubadas a 37 °C a 5% CO₂ em placas de culturas de 96 poços e mantidas por 96 horas na presença dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE, respectivamente nas concentrações de 2,0 µM à 0,03 µM e de 1,2 µM à 0,0185 µM.

3.2.2 Cultura Primária de Fibroblastos Humanos Normais

O fragmento de pele da região facial de aproximadamente 1 cm² obtidos de pacientes previamente selecionados e atendidos pelo Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP foram coletados de forma asséptica e imediatamente colocado em tubo cônico estéril contendo meio de cultura Ham F-12 (Gibco) + 20% soro fetal bovino (Cultilab). O fragmento foi transferido para uma placa de Petri P-35 mm contendo meio de cultura onde foi lavado para retirar o excesso de sangue e hemácias e com o auxílio de uma pinça e uma tesoura foi retirada a gordura e o tecido degenerado. O fragmento foi cortado em fragmentos diminutos, os quais foram distribuídos em 03 placas de Petri ($\pm$ 15 pedaços em cada) com meio de cultura. As placas foram levadas para a incubadora a uma atmosfera de 37 °C e 5% CO₂ e foram examinadas ao microscópio invertido 3 vezes por semana, o meio de cultura trocado neste mesmo intervalo de tempo.

Ao atingirem a subconfluência, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em garrafas de 25 cm² para a realização dos experimentos de citotoxicidade.

3.2.3 Cultura da Linhagem Tumoral de Melanoma Murino B16F10

A linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 foi cedida gentilmente pelo Instituto Ludwig, Genebra, Suíça. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura (RPMI - 1640), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. Antes das células atingirem confluência, as células foram subcultivadas para ampliação e congelamento (meio completo contendo 10% de dimetil-sulfóxido), e mantidas em nitrogênio líquido. As suspensões celulares utilizadas para a implantação no flanco dorsal dos animais foram obtidas após o tratamento dos frascos de cultura com tripsina 0,2% por 5 minutos e inativação com 10% de soro fetal bovino. As células desprendidas foram centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada por contagem em câmara de Mallassez.

3.2.4 Determinação da Atividade Citotóxica dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE pelo Método Colorimétrico MTT

A viabilidade celular das linhagens celulares tumorais e normais foram tratadas com as diferentes concentrações dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE, respectivamente de 2,0 μM à 0,0037 μM e de 1,2 à 0,0023 μM , diluídos em meio de cultura e avaliadas pelo método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)2,5-diphenil tetrazolium). Este método é baseado na redução do MTT a formazan pelas enzimas succinato desidrogenases mitocondrial presentes nas células vivas.

A determinação da sensibilidade das diferentes doses foi otimizada de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Nacional de Câncer, USA (NCI). Foram determinadas as atividades citotóxicas das suspensões das linhagens celulares normais e das células tumorais cultivadas em placas de 96 orifícios, fundo chato por 24 a 96 horas. Foram adicionados 10 ml de MTT (5mg/ml) às células, incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO_2 . Após este período, o meio foi removido e acrescentado 100 μL de dimetilsulfoxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da densidade óptica foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan MS) em comprimento de onda de 540 nm.

3.3 Ensaios *in vivo*

3.3.1 Delineamento Experimental

Foram empregados 30 camundongos da linhagem Balb-c fêmeas nos experimentos de migração celular no tecido subcutâneo e 40 camundongos da linhagem C57BL/6J fêmeas nos modelos experimentais de melanoma. Todos os animais pesavam aproximadamente 25g e idade aproximada de 6 a 8 semanas.

3.3.2 Avaliação da migração celular no tecido subcutâneo

A migração celular foi realizada através da análise do exsudato inflamatório no dorso dos camundongos Balb-c após a inoculação subcutânea dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE e análises após o período de 24 horas. Para a confecção da bolha foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais. Após a raspagem completa do dorso foram injetados subcutaneamente 3 mL de ar, formando uma bolha com aproximadamente $2,0 \times 4,0 \text{ cm}^2$ de área (Figura 4). Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais contendo 10 animais cada. Após 30 min da confecção da bolha foi injetado no dorso de cada animal do primeiro grupo, 300µL de solução salina, grupo controle. No segundo grupo foram injetados 300µL do peptídeo INKKI, com concentração de $2,0 \text{ µM}$ e o último grupo, injetados 300µL com o peptídeo YPVEPFTE na concentração de $1,2 \text{ µM}$. Após 24 horas, as amostras do exsudato inflamatório, lavado peritoneal e do sangue periférico foram recolhidas para análise quantitativa e qualitativa do influxo celular e contadas em câmara de Mallassez.

O segundo experimento seguiu os mesmos padrões do primeiro, contudo, os animais foram divididos somente em 2 grupos experimentais. O primeiro grupo foi composto pelos animais injetados somente com salina (grupo controle). O segundo grupo foi composto por animais injetados com 300µL do peptídeo INKKI nas concentrações entre $0,25 \text{ µM}$ à $2,0 \text{ µM}$. Após 24 horas, as amostras foram analisadas nos mesmos parâmetros que o experimento anterior.

Figura 4 – Fotografia da bolha formada no dorso em camundongo Balb – c. O círculo vermelho e as setas indicam a bolha subcutânea formada com 3 mL de ar medindo aproximadamente 2,0 x 4,0 cm.

3.3.3 Modelo experimental de melanoma murino

Os camundongos da linhagem C57BL/6J fêmeas utilizados para o desenvolvimento do melanoma experimental, foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1A. 15 camundongos da linhagem C57BL/6J que foram inoculados com 5×10^4 células de melanoma B16F10, administrado pela via subcutânea e

tratados após o 4º dia do implante com 2 μM do peptídeo INKIKI pela via subcutânea peri-tumoral.

Grupo 1B. 10 camundongos da linhagem C57BL/6J que foram inoculados com 5×10^4 células de melanoma B16F10, administrado pela via subcutânea e tratados após o 4º dia do implante com solução salina (grupo controle) pela via subcutânea peri-tumoral.

Grupo 2A. 15 camundongos da linhagem C57BL/6J que foram inoculados com 5×10^4 células de melanoma B16F10, administrado pela via subcutânea e tratados após o 4º dia do implante com 1,2 μM do peptídeo YPVEPFTE pela via subcutânea peri-tumoral.

3.3.4 Implantação das Células Tumorais

Os camundongos da linhagem C57BL/6J foram injetados subcutaneamente na região dorsal previamente depilada com 5×10^4 células tumorais de melanoma murino B16F10. Após o 4º dia do implante tumoral, os tumores dorsais visíveis foram medidos com o auxílio de um paquímetro e iniciados o tratamento com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE, diluídos em solução salina na concentração descrita anteriormente e injetados pela via subcutânea peri-tumoral. Como grupo controle os animais receberam solução salina pela mesma via de tratamento.

Após o 20º dia do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e em seguida, realizados a necropsia, os tumores dorsais analisados, lesões internas macroscópicas identificadas, medidas e fotodocumentadas. Amostras dos tumores e metástases dos diferentes grupos de tratamento e controle foram processadas para as análises do conteúdo de DNA, ciclo celular e anatomopatológico.

3.3.5 Observação do crescimento tumoral

Após a injeção de células B16F10, o crescimento tumoral foi medido e fotodocumentado, diariamente com o auxílio de um paquímetro para medições longitudinais e transversais do tumor (duas medidas). Foram calculados a área e o volume médio do tumor, através das seguintes fórmulas:

$$A=\pi R^2 \text{ e } V= 4/3\pi R^3 \text{ onde:}$$

A=área, R= raio, V= volume.

Os animais foram sacrificados a cada etapa de tratamento, necropsiados e os nódulos tumorais macroscópicos presentes nos órgãos internos foram contados e medidos.

3.3.6 Análises das Fases do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia, baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescente (fluorocromos), recursos de informática, utilizadas para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Esta tecnologia é usada para determinarem componentes e propriedades de células e organelas celulares que fluem através de uma suspensão celular. Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar às células ou partículas contidas em um meio previamente preparado e forçá-las a passarem por uma câmara especial (flow cell) que faz com que a células fiquem envolvidas e centralizadas em um fluxo contínuo de líquido (sheath fluid) e saiam dessa câmara uma atrás da outra de modo que somente uma única célula seja interceptada pelo feixe de laser (GIVAN et al., 1999).

Após ser interceptada pelo laser, uma parte de luz é espalhada (scatter) conforme suas características morfológicas e estruturais. O *Forward Scatter* (FS) relaciona-se com o tamanho da célula e o *Side Scatter* (SS) com a granulosidade de cada célula ou partícula (GIVAN et al., 1999).

Células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitada pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes e são

empregadas para examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células. Esses sinais luminosos são selecionados por filtros ópticos que bloqueiam determinados comprimentos de ondas e deixam passar somente a luz de comprimento de onda desejado. Os fluorocromos podem ser divididos em 05 (cinco) comprimento de onda, fluorescência verde (FL1), fluorescência amarela (FL2), fluorescência laranja (FL3), fluorescência (FL4) e fluorescência roxa (FL5) (GIVAN et al., 1999).

Portanto, a citometria de fluxo aplicada no estudo do ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população celular, revelando o índice de DNA, ploidia, a fração de proliferação celular, e a porcentagem de células encontradas nas fases G0/G1, S e G2/M, indicando parâmetros uni ou multivariáveis, prognósticos e possíveis rumos terapêuticos. A análise da porcentagem de células fornece o percentual de células que estão sintetizando DNA ("labeling index"), da duração da fase S (Ts) e do tempo de duplicação potencial (Tpot).

3.3.7 Determinação das fases do ciclo celular por Citometria de Fluxo

As suspensões celulares (10^6) dos tumores dorsais e ou das metástases dos grupos tratados com os peptídeos INKKI, YPVPEFTE e controles foram centrifugadas duas vezes a 3000 rpm com solução PBS e ressuspensas em 200 μ L solução de iodeto de propídio (20 mg/mL), 20 μ L de Triton X-100 e 4 mg RNase - A, por trinta minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período as amostras foram transferidas para tubos de citometria, e as imagens adquiridas em citômetro de Fluxo (Scalibur-Becton e Dickson) e analisadas em Software Cell-Quest. As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (hipodiplóide, G0-G1, fase S e G2-M) foram analisadas em software Modi-fit.

3.3.8 Contagem dos leucócitos totais, glóbulos vermelhos e plaquetas

O sangue total dos camundongos portadores de melanoma B16F10 tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE dos grupos 1A, 1B e 2A durante 20 dias foram coletados pela punção do plexo venoso retro-orbital com o auxílio de um microcapilar de 10 µl heparinizado. As coletas foram realizadas após o 7º, 14º e 21º dias do início do tratamento.

Para contagem de glóbulos vermelhos uma alíquota de 10µl do sangue de cada grupo tratado e controle foram diluídos na proporção 1:1000 em solução salina e 0,01% paraformaldeído, para a análise do número total. A contagem foi realizada em câmara de Malassez, e o número de células expressos em 10^9 /ml.

A contagem dos leucócitos totais foi realizada pela diluição de uma alíquota de 10µl do sangue de cada grupo tratado e controles diluídos em 90µl de solução de Turk (azul de metileno 0,5% em 30% de ácido acético glacial). A contagem foi realizada em câmara de Malassez, e o número de células foi expresso em 10^6 /ml.

Para a contagem das plaquetas alíquotas de 10µl do sangue total foi diluído em solução de oxalato de amônio a 1% (líquido de Brecker), a contagem realizada em câmara de Neubauer e o número de células expressas em 10^3 /mm³.

3.3.9 Análises histopatológicas

Foram retirados pequenos fragmentos de aproximadamente 0.2cm² dos órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, pâncreas e rins), dos animais tratados e controles, pesados e fixados por 24 horas em tampão formalina, tamponado com o pH = 7.4 para a realização de análises histopatológicas, também como de seus tumores e metástases, para serem corados possibilitando uma melhor visualização das manifestações ocorridas no microambiente celular, como diferenciação celular, neoformação vascular, apoptose, necrose, regeneração tecidual e hemorragias.

3.3.9.1 Preparo das amostras para as análises histopatológicas

Após período de fixação de 24 horas, utilizando-se lâmina histológica sobre tábua de macroscopia foram retiradas duas amostras retangulares. Todas as amostras foram acondicionadas em cápsula histológica e colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM 2145) para processamento “overnight”, sendo desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, foram diafanizadas em xilol contendo misturas seqüencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Realizada inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG 1160), os blocos foram microtomizados (Leica® modelo RM 2145) em cortes de 5µm e dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm, realizando-se dois níveis de corte para cada área de estudo e a seguir as lâminas foram coradas pelo método da hematoxilina-eosina. (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

3.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student e análise de variância ANOVA pelo programa (Instat versão 2.0), aplicando o nível de significância $p \leq 0.05$.

4 Resultados

4.1 Avaliação da atividade proliferativa dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE em culturas primárias de linfócitos T

Após 96 horas de incubação, as células de linfócitos T de camundongos foram plaqueadas em microplacas de 96 orifícios e adicionadas às diferentes concentrações dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE diluídos em meio de cultura. O tratamento com o peptídeo INKKI na concentração de 2 μ M apresentou uma resposta proliferativa semelhante ao mitógeno comercial PHA (fitohemaglutinina) utilizado como controle positivo e otimizado como agente mutagênico específico.

As culturas de linfócitos T tratadas com o peptídeo YPVEPFTE mostrou ter ação proliferativa significativamente ($p < 0,001$) maior do que a apresentada pelo mitógeno comercial PHA (fitohemaglutinina) na concentração de 1,2 μ M, enquanto que nas concentrações de 0,6 e 0,3 μ M apresentaram atividades semelhantes a do mitógeno comercial PHA. Os dados estão apresentados na figuras 5 e 6.

Figura 5 – Determinação da atividade proliferativa do peptídeo INKKI em cultura primária de linfócitos T mantida por 96 horas.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratado com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 6 – Determinação da atividade proliferativa do peptídeo YPVEPFTE em cultura primária de linfócitos T mantida por 96 horas.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

4.2 Avaliação do exsudato inflamatório

Após 24 horas de incubação dos peptídeos na região subcutânea no dorso, o exsudato inflamatório, foi lavado com solução fisiológica (1 mL) e as células retiradas para contagem e análise diferencial. O peptídeo INKKI, na concentração de 2,0 µM, mostrou aumento significativo no número de células infiltradas localizadas no exsudato inflamatório subcutâneo. O peptídeo YPVEPFTE, na concentração de 1,2 µM, não apresentou diferença significativa em relação ao controle basal, não induzindo a migração celular para o tecido subcutâneo. Os dados estão apresentados nas figuras 7, 8 e resumidamente na tabela 1.

Figura 7 - Análise do número total de células infiltradas no tecido subcutâneo do dorso de camundongos Balb-C após 24 horas da administração dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA), ns (não significativo).**

Figura 8 - Análise das populações celulares presentes no infiltrado no tecido subcutâneo do dorso de camundongos Balb-C, obtida em citometria de fluxo, após 24 horas da administração de solução fisiológica (controle - A), e dos peptídeos da caseína INKKI (B) e YPVEPFTE (C). A região R1 representa populações de hemácias, R2 população de linfócitos, R3 população de monócitos e R4 população de eosinófilos. Histograma adquirido pelo programa Cell-Quest.

Tabela 1 – Valores das médias das populações de células infiltradas no tecido subcutâneo do dorso de camundongos Balb-C após 24 horas da administração de solução fisiológica (controle) e dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE.

Tratamento	Controle	INKKI	YPVEPFTE
População celular			
X (10⁵ cel/mL)	11.00	49.20*	14.50
±dp	± 2.0	± 3.84	± 2,18

Valores expressos em média (x) e desvio padrão (± d.p.)

* Diferença estatística entre os grupos controle x tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE.

De acordo com os resultados obtidos foi delineado o segundo grupo experimental, utilizando somente o peptídeo INKKI em diversas concentrações, uma vez que o peptídeo YPVEPFTE não apresentou diferença significativa na indução da resposta inflamatória local. As concentrações injetadas no dorso dos camundongos Balb-c foram de 0,25 µM, 0,50 µM, 1,0 µM e 2,0 µM diluídos em solução salina. Após 24 horas de incubação foram colhidas as amostras do exsudato inflamatório, do sangue periférico e do lavado peritoneal. No exsudato inflamatório subcutâneo no dorso o peptídeo INKKI, somente a partir da concentração de 1,0 µM e 2,0 µM, apresentou um aumento significativo no número total de células infiltradas ($p < 0,002$).

A análise do número de leucócitos totais do sangue periférico mostrou uma significativa redução em todas as concentrações do peptídeo INKKI administrados e colhidos após 24 horas.

No lavado peritoneal, nossos resultados mostraram que houve uma progressiva redução no número total de células de acordo com as concentrações

administradas após 24 horas, caracterizando ser dose dependente. Na concentração de 2,0 μM , o peptídeo INKKI, apresentou redução significativa ($p < 0,0012$) no número total de células residentes em relação ao grupo controle. Os dados estão apresentados nas figuras 9, 10 e 11.

Figura 9 - Análise do número total de células infiltradas no tecido subcutâneo do dorso de camundongos Balb-C, após 24 horas da administração do peptídeo INKKI.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 10 - Análise do número total de células no sangue periférico dos camundongos Balb-C após 24 horas da administração do peptídeo INKKI.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 11 - Análise do número total de células no peritônio de camundongos Balb-C, após 24 horas da administração do peptídeo INKKI.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

4.3 Avaliação da atividade citotóxica dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE nas células de melanoma B10F10

Após 24 horas de cultura na fase de crescimento exponencial das células de melanoma B16F10, as células foram plaqueadas em microplacas de 96 orifícios e adicionadas as diferentes concentrações dos peptídeos diluídos em meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas de tratamento com o peptídeo INKKI nas concentrações de 2,0 μM a 0,0075 μM . Os resultados mostraram ser citotóxicos nas concentrações de 2,0 μM a 0,03 μM ($p < 0,001$). As diluições apresentaram uma diminuição da atividade citotóxica dose dependente.

Nessas condições foi determinada a concentração inibitória IC 50% a partir da determinação da equação da reta e do coeficiente de correlação. Nossos resultados para a IC 50% foi de 0,23 μM e o coeficiente de correlação foi de $R^2=0,98$. Os dados estão apresentados nas figuras 12 e 14.

Os experimentos realizados com o peptídeo YPVEPFTE empregaram a mesma metodologia utilizada com o peptídeo INKKI. A viabilidade celular foi avaliada após 24 de tratamento com o peptídeo YPVEPFTE nas concentrações de 1,2 μM a 0,0023 μM . O peptídeo apresentou atividade citotóxica somente na concentração de 1,2 μM , ocorrendo uma diminuição em média de 20% na viabilidade celular, porém não significativa ($p<0,065$). Nessas condições foi determinada a concentração inibitória IC 50% a partir da determinação da equação da reta e coeficiente de correlação. Nossos resultados para a IC 50% foi de 7,3 μM e o coeficiente de correlação foi de $R^2= 0,38$, não apresentando correlação significativa com a atividade citotóxica do peptídeo YPVEPFTE. Os dados estão apresentados nas figuras 13 e 15.

Figura 12 - Determinação da atividade citotóxica do peptídeo INKKI em células de melanoma B16F10.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 13 – Determinação da atividade citotóxica do peptídeo YPVEPFTE em células de melanoma B16F10.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 14 – Curva de regressão linear e concentração inibitória (IC50%) da atividade citotóxica do peptídeo INKKI em células de melanoma B16F10.

Figura 15 – Curva de regressão linear e concentração inibitória (IC₅₀%) da atividade citotóxica do peptídeo YPVEPFTE em células de melanoma B16F10.

4.4 Avaliação da atividade citotóxica dos peptídeos INKKI e YPVEPFTE em fibroblastos humano normal

Após 24 horas de cultura, os fibroblastos humanos (FN1) foram plaqueados em microplacas de 96 orifícios e adicionados a diferentes concentrações dos peptídeos diluídos em meio de cultura. A viabilidade celular, após 24 horas de tratamento com o peptídeo INKKI nas concentrações de 2,0 μM a 0,0075 μM mostrou que o peptídeo não exerce significativa atividade citotóxica em culturas de fibroblastos humanos normais FN1. Os dados estão representados na figura 16.

O experimento realizado com o peptídeo YPVEPFTE, empregou a mesma metodologia utilizada com o peptídeo INKKI. A viabilidade celular após 24 de

tratamento com o peptídeo YPVEPFTE nas concentrações de 1,2 μM a 0,0023 μM também não exerceu atividade citotóxica em culturas de fibroblastos humanos normais FN1. Os dados estão apresentados na figura 17.

Não se observou efeitos proliferativos significativos quando os fibroblastos humanos normais FN1 foram tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE.

Figura 16 - Determinação da atividade citotóxica do peptídeo INKKI em células de fibroblastos humano FN1.

Figura 17 - Determinação da atividade citotóxica do peptídeo YPVEPFTE em células de fibroblastos humano FN1.

4.5 Análises das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Os animais portadores de melanoma B16F10 foram tratados durante 20 dias consecutivos com os peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE, respectivamente nas concentrações de 2,0 μM e 1,2 μM pela via subcutânea peritumoral. Após as necrópsias dos grupos de animais portadores de tumor dorsal tratado e dos grupos controles foram avaliadas as fases do ciclo celular por citometria de fluxo e determinada a porcentagem das células nas seguintes fases: sub G1 ou morte celular que apresentam DNA fragmentado, G0/G1 células quiescentes não proliferadas, Fase S em síntese de DNA e G2/M em divisão celular.

Os resultados mostraram que as células tumorais B16F10 obtidas dos tumores dorsais do grupo controle tratados com solução fisiológica apresentaram $30.4 \pm 5.3\%$ em morte celular (sub-G1), $20.9 \pm 1.9\%$ células quiescentes (G0/G1), $9.3 \pm 0.8\%$ em síntese de DNA (S) e $41.9 \pm 5.9\%$ em divisão celular (G2/M). Os dados estão representados na figura -18 e 19 A.

Os tumores dos animais tratados com $2,0 \mu\text{M}$ do peptídeo INKKI apresentaram aumento extremamente significativo na proporção de células na fase sub-G1 (morte celular) $81.6 \pm 5.9\%$ ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Foram observados, que também houve diminuições extremamente significantes ($p < 0,001$) na porcentagem de células G0/G1 ($7.6 \pm 1.3\%$) e em células com capacidade de síntese de DNA, fase S, ($2.3 \pm 0.6\%$) em comparação ao controle. A proporção das células com capacidade proliferativa (G2/M) foi significativamente menor ($p < 0,001$) nas células tumorais tratadas com $2,0 \mu\text{M}$ do peptídeo INKKI ($4.6 \pm 0.9\%$) em relação ao controle tratado com solução fisiológica ($41.9 \pm 5.9\%$). Os dados estão representados nas figuras 18 e 19 B e resumidamente na tabela 2.

O grupo experimental tratado com $1,2 \mu\text{M}$ do peptídeo YPVEPFTE apresentou aumento significativo ($p < 0,01$) na proporção de células na sub-G1 (morte celular) $52.1 \pm 6.6\%$ em relação ao grupo controle. Já as células quiescentes não foram estatisticamente diferentes ($20.9 \pm 4.7\%$). Os resultados também mostraram que houve significativa ($p < 0,01$) diminuição na porcentagem de células na fase de síntese de DNA ($3.9 \pm 0.7\%$) e na fase de divisão celular ($25.9 \pm 1.4\%$), em relação ao controle. Os dados estão representados nas figuras 20 e 21 B e resumidamente na tabela 2.

(A)

(B)

Figura 18 – Histograma representativo das médias e das populações de células tumorais dorsais de melanoma dos animais do grupo controle, nas diferentes fases do ciclo celular (A). Populações de células tumorais dorsais de melanoma dos animais tratados com 2,0 μ M do peptídeo da caseína INKKI nas fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo (B).

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 19 – Gráfico da distribuição do conteúdo de DNA por citometria de fluxo representando as fases do ciclo celular (M1 – Fase G2/M), (M2 – Fase S), (M3 – Fase G0/G1) e (M4 e M5 – Sub-G1), analisadas pelo programa MOD-FIT. (A) Células tumorais dorsais de melanoma dos animais do grupo controle. (B) Células tumorais dorsais de melanoma dos animais tratados com 2,0 μ M do peptídeo da caseína INKKI.

Figura 20 – Histograma representativo das médias e das populações de células tumorais dorsais de melanoma dos animais do grupo controle, nas diferentes fases do ciclo celular (A). Populações de células tumorais dorsais de melanoma dos animais tratados com 1,2 μ M do peptídeo da caseína YPVEPFTE nas fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo (B).

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 21 - Gráfico da distribuição do conteúdo de DNA por citometria de fluxo representando as fases do ciclo celular (M1 – Fase G2/M), (M2 – Fase S), (M3 – Fase G0/G1) e (M4 e M5 – Sub-G1), analisadas pelo programa MOD-FIT. (A) Células tumorais dorsais de melanoma dos animais do grupo controle. (B) Células tumorais dorsais de melanoma dos animais tratados com 1,2 μ M do peptídeo da caseína YPVEPFTE.

Tabela 2 – Valores das médias das populações celulares nas fases do ciclo das células de melanoma B16F10 dos grupos: controle e tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE.

Linhagem B16F10	Sub-G1(%)	G0/G1(%)	S(%)	G2/M(%)
Tratamento	X $\pm$ dp	X $\pm$ dp	X $\pm$ dp	X $\pm$ dp
Controle	30.4 $\pm$ 5.3	20.9 $\pm$ 1.9	9.3 $\pm$ 0.8	41.9 $\pm$ 5.9
INKKI	81.6 $\pm$ 5.9*	7.6 $\pm$ 1.3*	2.3 $\pm$ 0.6*	4.6 $\pm$ 0.9*
YPVEPFTE	52.1 $\pm$ 6.6*	20.9 $\pm$ 4.7	3.9 $\pm$ 0.7*	25.9 $\pm$ 1.4*

Valores expressos em média (x) e desvio padrão ($\pm$ d.p.)

* Diferença estatística entre os grupos controle x tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE.

4.6 Análises macroscópicas dos tumores do Melanoma B16F10 tratados com os peptídeos INKKI e YPVPFTE

Após o 14º dia da implantação de 5×10^4 células tumorais na região dorsal, 100% dos animais do grupo controle apresentavam tumores dorsais próximos aos locais de inoculação com volume médio de $0,10 \pm 0,05 \text{ cm}^3$. Os animais de todos os grupos de experimentação tratados e controle foram pesados e realizados a medição (comprimento x largura) dos tumores diariamente com o auxílio do paquímetro e foto-documentação.

Os animais foram monitorados diariamente e após 20 dias de tratamento consecutivos com respectivamente 2,0 μM e 1,2 μM dos peptídeos da caseína

INKKI e YPVEPFTE administrado pela via subcutânea peri-tumoral, foram sacrificados por deslocamento cervical, necropsiados e os tumores dorsais e os órgãos internos (coração, pulmão, fígado, rins e baço), pesados e fixados por 24 horas em tampão de formalina, tamponado pH=7.4 para a realização das análises histopatológicas.

Macroscopicamente, os animais do grupo controle apresentaram tumores com extensas áreas pigmentadas e nodulares, ulcerados, extensas áreas hemorragias e vascularizada, gânglios linfáticos popliteais com metástase e os drenantes apresentando linfadenopatias, fígado anêmico e baço aumentado com pontos de metástase (Figura – 22).

Os animais tratados com 2,0 μ M do peptídeo INKKI, macroscopicamente, apresentavam-se com massas nodulares dorsais não pigmentadas, não ulceradas e com raras áreas de irrigação. Observou-se a formação de tecido encapsulado característico de fibrose, a massa nodular não se mostrava aderida à superfície interna abdominal, características de tumores benignos fibrosados. Os gânglios popliteais linfáticos apresentavam-se aumentados sem focos de metástases, baço aumentado aparentemente sem metástase, fígado não anêmico, rins e pulmões normais aparentemente sem metástase (Figuras – 23 e 24).

O grupo tratado com 1,2 μ M do peptídeo YPVEPFTE, macroscopicamente, mostrou-se com grandes massas nodulares não pigmentadas e com algumas regiões pigmentadas, com raras áreas de irrigação, formação de tecido encapsulado característico de fibrose, a massa tumoral não se apresentava aderida à superfície abdominal interna. Os órgãos internos (gânglios linfáticos popliteais, baço, rins, fígado e pulmões) apresentaram significativa redução na incidência de metástase (Figura – 25).

Figura 22 - Aspectos macroscópicos dos tumores de melanoma dorsal do grupo controle. Observa-se extensa massa tumoral dorsal pigmentada (A e B). Em C a seta indica o sítio metastático no gânglio linfático popliteal. Observa-se massa tumoral pigmentada (D), com grandes áreas hemorrágicas, vascularizadas e gânglios linfáticos popliteais apresentando pontos metastáticos (seta).

Figura 23 - Aspecto macroscópico dos tumores de melanoma dorsal tratado com o peptídeo INKKI. Observa-se pequena massa tumoral (A). As setas mostram os gânglios linfáticos popliteais aumentados sem metástases e com raras áreas irrigadas (B e C). Observa-se formação de tecido encapsulado característico de fibrose, a massa não se mostrou aderida à superfície abdominal (C e D).

Figura 24 - Aspecto macroscópico dos tumores de melanoma dorsal tratado com o peptídeo INKKI. Observa-se ausência da massa tumoral (A e B). Os gânglios linfáticos popliteal aumentado sem metástase e com raras áreas irrigadas (Figura – C). Nota-se o ponto de inoculação do tumor (seta) e raras áreas irrigação (Figura – D).

Figura 25 - Aspecto macroscópico dos tumores de melanoma dorsal tratado com o peptídeo YPVEPFTE. Observa-se massa tumoral pigmentada (A) e ulcerada (Figura B). Massa tumoral envolta por uma cápsula fibrosa e com alguns pontos pigmentação observa-se raras áreas de vascularização.

Os parâmetros de inibição e da eficácia do crescimento tumoral foram avaliados pela incidência, taxa de sobrevivência, área tumoral e número de metástases. Os animais portadores de melanoma dorsais tratados com 2,0 μ M do peptídeo INKKI apresentaram redução significativa da massa tumoral de 78,4% em comparação ao grupo controle. A análise após a dissecação mostrou que as lesões ocupam área e volume extremamente reduzido com características amorfas e metástases somente em 30% dos camundongos tratados. A distribuição das metástases e nódulos internos nos camundongos tratados com o peptídeo INKKI foi distribuída com maior incidência nos gânglios linfáticos popliteais drenantes e somente em um caso no parênquima pulmonar. Portanto, não foram detectadas metástases macroscópicas em órgão alvo como no fígado, baço e ausência significativa de vascularização no sítio de inoculação do tumor ou mesmo quando positivo mostrou-se fibrosado, como também não apresentaram sinais de anemia e caquexia. Os dados estão apresentados nas figuras 26, 27 e 28.

Nos camundongos tratados com 1,2 μ M do peptídeo YPVEPFTE a curva de crescimento tumoral foi avaliada seguindo os mesmos critérios utilizados com o peptídeo INKKI. Foi observado que os animais portadores de melanoma dorsais tratados com o peptídeo YPVEPFTE apresentaram redução significativa da massa tumoral de 62,4% em comparação ao grupo controle.

A distribuição das metástases internas dos camundongos tratados com o peptídeo YPVEPFTE apresentou maiores incidências nos gânglios linfáticos popliteais e no parênquima esplênico. Foi observada redução da incidência do número de metástases em 30% dos animais tratados e em comparação aos animais tratados com solução fisiológica. Os dados estão apresentados nas figuras 26, 27 e 28.

Em nenhum grupo experimental foi observada a formação em órgãos internos de modificações estruturais dignas de nota, como áreas hemorrágicas, exsudato peritoneal, infecções e hemorragia no parênquima pulmonar ou mesmo sinais de anemia ou caquexia.

Figura 26 – Avaliação do volume tumoral dos camundongos portadores de melanoma dorsal B16F10 durante o tratamento com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE.

Figura 27 – Análise do número total de metástases, após necropsia dos animais portados de melanoma dorsal tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPFTE e grupo controle.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 28 – Análise da distribuição do número de metástases internas dos animais portadores de melanoma dorsal tratados com os peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE e grupo controle.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

4.7 Avaliações histopatológicas dos tumores dorsais e lesões metastáticas dos grupos tratados com os peptídeos da caseína INKKI, YPVEPFTE e controle

Após 20 dias de tratamento dos animais portadores de melanoma B16F10 com peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE, os camundongos foram fotodocumentados, necropsiados e realizadas as análises histopatológicas dos tumores dorsais e lesões metastáticas.

Os animais do grupo controle apresentaram massas tumorais dorsais volumosas, ocupando em torno de 40 – 60% de seu peso corpóreo, seus tumores macroscopicamente apresentavam-se nodulares, pigmentados, ulcerados e necróticos. Histologicamente foi observado massa tumoral pleomórfica (várias formas e tamanhos celulares) evidenciando células tumorais em divisões celulares (seta A), pigmento melânico intra e extracelular (seta B) (Figura 29). Na figura 30, visualizam-se vasos sanguíneos intratumoral (A), pigmento melânico intra e extracelular (seta B) e extensa área de densidade de células tumorais (C). Não foram observados infiltrados inflamatórios, intra ou peri-tumorais.

Figura 29 – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 do grupo controle.

Figura 30 – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 do grupo controle.

Os animais portadores de melanoma tratados com o peptídeo da caseína INKKI apresentaram pequena densidade de células tumorais, núcleo picnótico (B), discreto infiltrado inflamatório monolinfonucleares, matrix extracelular espessa, com pigmentos melânicos (acastanhados) (C) e pequenos vasos intermeados a massa tumoral (D) (Figura 31). Nas figuras 32 A e B, observam-se células em degeneração, núcleos fragmentados e pequenos corpos apoptóticos, característicos de células apoptóticas (seta A) e discreto infiltrado inflamatório (seta B)

Figura 31 – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína INKKI.

Figura 32 A e B – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína INKKI.

Por outro lado, os animais portadores de melanoma tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE apresentaram grande densidade de células tumorais pleomórficas (várias formas e tamanhos celulares) (A), citoplasma exibindo pigmento melânico (acastanhado). A massa tumoral permeada por uma grande rede neovascular, irrigada (B) e células tumorais exibindo figuras de divisão celular (mitose) (seta C). Não foi observado infiltrado inflamatório intra e peritumoral (Figura 33). Na figura 34, nota-se a presença de vasos neoformado (A) e parede vascular irregular (seta B).

Figura 33 – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE.

Figura 34 – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE.

Os animais tratados com $3,75 \mu\text{M}$ do quimioterápico comercial Paclitaxel, apresentaram diminuição parcial da densidade das células tumorais, ausência de infiltrado inflamatório intratumoral e a presença de grandes áreas necróticas (Figura 35 A e B).

Figura 35 A e B – Fotomicrografia dos tumores dorsais B16F10 tratados com 3,75 μ M do quimioterápico comercial Paclitaxel.

Os animais do grupo controle apresentaram uma quantidade significativa de lesões metastáticas em órgãos internos, principalmente linfonodo popliteal drenante, pulmão e baço. No linfonodo popliteal drenante, observa-se reatividade

difusa tanto periférica quanto lobular sem o predomínio da proliferação dos centros germinativos (Figura 36).

Figura 36 – Fotomicrografia do linfonodo popliteal drenante de camundongos controle com tumores dorsais B16F10.

Nos animais portadores de melanoma B16F10 tratados com o peptídeo da caseína INKKI, observa-se aumento dos gânglios linfáticos com predomínio da proliferação na região periférica rica em centros germinativos (A) (figura 37).

Figura 37 – Fotomicrografia do linfonodo popliteal drenante de camundongos com tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína INKKI.

Nos animais portadores de melanoma B16F10 tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE, observa-se gânglios linfáticos reativos com a presença de células tumorais (metástase) (A) (Figura 38), apresentando pleomorfismo celular, pigmentos acastanhados no interior das células (B) e células em divisão celular (mitose) (C) (Figuras 39 e 40).

Figura 38 – Fotomicrografia do linfonodo popliteal drenante de camundongos com tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE.

Figura 39 – Fotomicrografia do linfonodo popliteal drenante de camundongos com tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE.

Figura 40 – Fotomicrografia do linfonodo popliteal drenante de camundongos com tumores dorsais B16F10 tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE.

4.8 Avaliações dos parâmetros hematológicos dos animais portadores de melanoma B16F10 tratados com os peptídeos INKKI e YPVEPTE

As amostras sanguíneas de animais tratados com os peptídeos INKKI, YPVEPFTE, respectivamente nas concentrações de 2,0 μM e 1,2 μM e grupo controle foram colhidas no 7º, 14º e 21º dia, após o implante das células B16F10 na presença do anticoagulante-heparina pelo plexo venoso retro-orbital e os animais foram mantidos durante a experimentação e coleta das amostras em condições normais e não estressantes sem o uso de sedação ou anestesia.

As análises hematológicas do tratamento com o peptídeo INKKI na concentração de 2,0 μM administrada pela via subcutânea peri-tumoral,

apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) no número total de glóbulos vermelhos em relação aos camundongos portadores de melanoma tratados com solução salina. Não foram observados estados de anemia ou hemorragia induzido pelo tratamento. Os dados estão apresentados na figura 41.

A análise quantitativa do número total de plaquetas dos animais portadores de melanoma B16F10 tratados com o peptídeo INKKI mostrou significativa redução ($p < 0,001$) durante todo o tratamento em relação aos camundongos portadores de melanoma tratados com solução salina. Não ocorreu a formação de alterações estruturais nas plaquetas, não foram observadas macro, micro ou a presença de agregados plaquetários. Os dados estão apresentados na figura 42.

O tratamento com o peptídeo INKKI nos animais portadores de melanoma não mostrou diferença significativa no número de leucócitos entre o controle tratado com solução fisiológica. Os dados estão apresentados na figura 43.

Figura 41 - Número de glóbulos vermelhos dos animais portadores de melanoma B16F10 dos grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI (2,0 μM).
****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 42 - Análise quantitativa do número de plaquetas dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI (2,0 μ M).

**Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA)

Figura 43 - Análise quantitativa do número de leucócitos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com o peptídeo INKKI (2,0 μ M).

As análises hematológicas do tratamento com o peptídeo YPVEPFTE na concentração de 1,2 μ M administrada pela via subcutânea peri-tumoral, nos animais portadores de melanoma apresentaram aumento, porém não significativo no número total de glóbulos vermelhos em relação aos camundongos portadores de melanoma tratados com solução salina. Somente após o 21º dia de tratamento observou-se aumento no número de glóbulos vermelhos. Os dados estão apresentados na figura 44.

O grupo tratado com o peptídeo YPVEPFTE apresentou uma redução extremamente significativa ($p < 0,001$) no número total de plaquetas dos animais portadores de melanoma B16F10 durante todo o tratamento, em relação aos camundongos portadores de melanoma tratados com solução salina. Os dados estão apresentados na figura 45.

Os tratamentos com o peptídeo YPVEPFTE nos animais com melanoma dorsal mostraram que o composto induz um aumento extremamente significativo ($p < 0,001$) no número de leucócitos, após o 14º e 21º dias do implante tumoral. Os dados estão apresentados na figura 46.

Figura 44 - Número de glóbulos vermelhos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com o peptídeo YPVEPFTE (1,2 µM). **Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).

Figura 45 - Análise quantitativa do número de plaquetas dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com o peptídeo YPVEPFTE.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

Figura 46 - Análise quantitativa do número de leucócitos dos animais portadores de melanoma B16F10, grupos controle e tratados com o peptídeo YPVEPFTE.

****Diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com o peptídeo (Teste estatístico de Variância de ANOVA).**

5 Discussão

O crescente aumento na produção de alimentos industrializados tem criado, cada vez mais, uma demanda de ingredientes que associam propriedades fisiológicas e funcionais. As frações protéicas do leite agregam valores nutricionais, funcionais e fisiológicos, que podem ser isolados e utilizados pelas indústrias farmacêuticas, de alimentos funcionais e biotecnológicos.

O leite é uma matéria-prima de importância fundamental para a indústria de alimentos. O fracionamento do leite fornece uma série de produtos como o soro ácido, caseinatos, co-precipitado protéico de caseína e soro, coágulo de caseína, soro doce, concentrados isolados protéicos do soro e lactoalbumina, indicados para inúmeras aplicações.

As caseínas são os principais constituintes do leite de diversas espécies. Os peptídeos obtidos pela hidrólise da caseína apresentam propriedades bioativas e são liberados durante a digestão por meio de proteinases intestinais, melhorando a absorção de cálcio por aumentar sua biodisponibilidade.

A β -caseína representa 36% da caseína bovina. Os peptídeos INKKI e YPVEPFTE foram isolados a partir da β -caseína bovina correspondendo às seqüências 26-30 e 114-121 respectivamente. O penta peptídeo INKKI, de acordo com a estrutura secundária proposta por Kumosinski et al. (1993), localiza-se em um braço hidrofílico resultado da combinação de estruturas β -pregueada, turns, α -hélice, caracterizado por ser um dos sítios de clivagem pela plasmina (resíduos 28-29) e próximo de uma região com uma trinca de fosfoserinas, (resíduos 17-19).

A β -caseína apresenta 5 resíduos de PO_4 e esses grupamentos estão esterificados por ligações monoéster de serina, localizadas em um loop na superfície e prontamente expostos para interagir com íons de Ca^{2+} ou sofrer desfosforilação por ação de fosfatases (KUMOSINSKI et al., 1993).

A presença de sítio fosforilado conduz a um aumento na hidrofiliabilidade e na mobilidade do sítio peptídico. A antigenicidade de uma proteína tem sido associada à hidrofiliabilidade, mobilidade e propensão à formação de estruturas β -pregueada. Todas essas características são encontradas nos sítios fosforilados da β -caseína, mostrando uma elevada possibilidade dessas regiões se localizarem nos epítomos ou muito próximos a eles. Estudo desenvolvido por Zhang e Othani (2003) confirmou que os anticorpos reconhecem regiões fosforilada da β -caseína.

Até 1998 a literatura apresentava poucas evidências de que os peptídeos da caseína pudessem exercer atividades imunomoduladoras. No mesmo ano, Meisel (1997) em comunicação prévia demonstrou que os peptídeos da caseína possuíam efeitos imunomoduladores.

Hata et al. (1999) avaliaram a atividade imunoestimuladora dos peptídeos da caseína em culturas de baço, timo e intestino de ratos; demonstrando que estes peptídeos são responsáveis pelo aumento da produção de imunoglobulinas em células esplênicas.

Otani et al. em 2001 pesquisaram o domínio responsável pela proliferação de linfócitos e produção de IgA, usando o fragmento 1-28 da β -caseína bovina. Este trabalho avaliou a proliferação de linfócitos B estimulados com LPS de *Salmonella typhimurium* e linfócitos T, pelo uso de PHA e concanavalina A, bem como, a produção de IgA secretórias. A adição de 2 nM da sequência 1-28 da β -caseína bovina exibiu uma significativa atividade mitogênica em linfócitos B e T na ausência dos mitógenos comerciais LPS, PHA e Con-A. O fragmento também foi responsável pelo aumento significativo nos níveis das imunoglobulinas (IgG / IgM / IgA).

Para avaliar as regiões responsáveis pelas atividades proliferativa de linfócitos B e T e liberação de imunoglobulinas, os autores cultivaram as células com 8 (oito) tipos dos fragmentos parciais quimicamente sintetizados da β -caseína bovina, com concentração de 2 nM, na presença e ausência dos mitógenos comerciais. Dos 8 (oito) tipos de fragmentos parciais sintetizados, 6 (seis) aumentaram significativamente a proliferação de linfócitos B e T. Os dois tipos que não apresentaram atividades foram de seqüências desfosforiladas (14-21) e (17-18) amido. Esses 6 (seis) fragmentos parciais sintetizados também aumentaram os níveis de imunoglobulinas (IgG/IgM/IgA). Os autores concluíram que os peptídeos que apresentam a seqüência SerP – X – SerP, são responsáveis pela atividade imunorregulatória (OTANI et al., 2001).

Kawhara et al. (2004) avaliaram o efeito na resposta proliferativa, o aumento da liberação de IgA e a expressão do mRNA para interleucina 6 em linhagens de células humanas imunocompetentes. Neste trabalho os autores usaram o fragmento 1-28 da β -caseína bovina, purificada a partir de preparações de fosfopeptídeos de caseína comercial, em linhagens de células T (HUT-78, Jurkat

Clone E6-1 e MOLT-4), linhagens de células B (BALL, KHM-1B e U266B1) e linhagens de monócitos (U937 e HL-60).

Os resultados obtidos por Kawahara et al. (2004) mostraram que o fragmento 1-28 da β -caseína bovina na concentração de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ induz aumento significativo de forma dose-dependente da proliferação em todas as três linhagens de linfócitos T. Nas linhagens de linfócitos B, o mesmo fragmento da β -caseína bovina, também foi capaz de aumentar significativamente a proliferação. Os autores avaliaram a produção de IgA em culturas de KHM-1B na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ do fragmento 1-28 da β -caseína bovina observaram que houve aumento na produção de IgA de aproximadamente 1,3 vezes em comparação as culturas não tratadas com o peptídeo.

Kawahara et al. (2004) determinaram os níveis de expressão de mRNA para IL-6 em linhagem U266B1 e KHM-1B, cultivada com 100 $\mu\text{g/mL}$ do fragmento 1-28 da β -caseína bovina foi capaz de aumentar em 1,3 e 4,9 vezes a expressão do mRNA para IL-6 em células U266B1 e KHM-1B, respectivamente. Não foi observado o aumento na expressão do mRNA para IL-6 em culturas de linfócitos T e monócitos. O fragmento 1-28 da β -caseína bovina aumenta a resposta proliferativa em células B T e monócitos, aumenta a produção de IgA por células B e aumenta a expressão do mRNA para IL-6.

Em nosso trabalho foram utilizadas culturas primárias de linfócitos T para avaliar os efeitos proliferativos dos peptídeos da caseína INKKI e YPVEPFTE. O tempo de incubação de 96 horas e as concentrações dos peptídeos foram as mesmas descritas em outros trabalhos como no trabalho de Kawahara et al., (2004).

Otani et al. (2001), mostraram que a atividade proliferativa dos fragmentos parciais sintetizados esta diretamente relacionada com regiões fosforiladas do peptídeo. Porém nossos resultados mostraram que o peptídeo da β -caseína 26-30 INKKI, localizado em uma região não fosforilada de estrutura β -pregueada, apresentou atividade proliferativa semelhante ao mitógeno comercial PHA. O mecanismo pelo qual esse pentapeptídeo da caseína exerce a atividade proliferativa em linfócitos T ainda não está bem estabelecido na literatura.

O peptídeo da caseína YPVEPFTE, localiza-se em uma região rica em prolina, de cadeia aberta e não fosforilada. Apesar da ausência dessas regiões fosforiladas, nossos resultados mostraram que o octapeptídeo, na concentração de

1,2 μ M, incubado por 96 horas apresentou significativa atividade proliferativa ($p < 0,001$) superior a apresentada pelo mitógeno comercial PHA, enquanto que nas concentrações de 0,6 e 0,3 μ M apresentaram atividades semelhantes, quando comparadas ao mitógeno comercial PHA. Portanto, nosso trabalho mostra que os peptídeos da INKKI e YPVEPFTE apresentam atividade proliferativa em culturas primárias de linfócitos T por outra via, não dependente de regiões fosforiladas.

O aumento do efeito proliferativo, da liberação de IgA e da expressão de mRNA para IL-6 em linfócitos B e T e em culturas de monócitos, não são as únicas atividades desempenhadas pelos peptídeos da caseína descrita pela literatura. Kitazawa et al. (2007) relataram que a digestão enzimática da β -caseína libera um potente peptídeo quimiotático para monócitos e macrófagos.

Kitazawa et al. (2007) utilizaram a pepsina, proteinase K, tripsina, α -quimotripsina, termolisina, papaína e actinase E para digerir a β -caseína bovina. Os fragmentos gerados foram ultra filtrados e recolhidas as amostras com peso molecular abaixo de 3 kDa., e avaliaram o efeito quimiotático em culturas de macrófago da linhagem J774-1 e monócitos humanos *in vitro*.

Os autores mostraram que antes da digestão, a β -caseína íntegra exibe uma moderada atividade quimiotática em cultura de macrófagos. Em macrófagos, somente as amostras digeridas com proteinase K, actinase E e papaína apresentaram significativa atividade quimiotática. Por outro lado, culturas de monócitos humanos, somente as amostras digeridas com actinase E e papaína foram capazes de induzir significativamente a migração celular.

A amostra que apresentou maior atividade na migração em ambas as linhagens celulares foi aquela digerida com a actinase E. Os autores realizaram a purificação e o seqüenciamento desse peptídeo; revelando um pentapeptídeo correspondendo à seqüência 114-118, YPVEP, denominado pelos autores de β -casoquimiotídeo 1 (Kitazawa et al., 2007). Os autores investigaram os receptores envolvidos no mecanismo de ação pelo qual o β -casoquimiotídeo 1 apresenta atividade quimiotática. Em culturas de monócitos pré-tratadas com as toxinas *pertussis* e toxina *cholera*, o β -casoquimiotídeo 1 foram capazes de inibir completamente migração em culturas de monócitos humanos. Já as culturas pré-tratadas com a toxina *cholera* não foram capazes de inibir a migração, indicando que a ação do β -casoquimiotídeo 1 é pela via do receptor ligado a proteína G. Portanto, o β -casoquimiotídeo 1 pode promover a resposta na imunidade inata do

hospedeiro por induzir a ativação e migração de macrófagos e monócitos (Kitazawa et al., 2007).

Desta forma, é importante o estudo da migração celular para o processo inflamatório. Poucos modelos experimentais foram utilizados e analisados com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória celular induzida pelos peptídeos.

Foi utilizado como ponto de partida para o nosso trabalho, o modelo descrito por Edwards et al. (1981) para produção das bolsas de ar subcutâneas e análise do exsudato inflamatório em um sistema *in vivo*. Em outros estudos, este modelo tem sido usado extensamente para análise da resposta inflamatória experimental (De SOUZA, 2000).

Após 24 horas de incubação na região subcutânea no dorso com 2,0 e 1,2 μ M dos peptídeos da β -caseína bovina INKKI e YPVEPFTE, respectivamente, as células contidas neste sistema foram lavadas, colhidas e contadas. O peptídeo da caseína INKKI apresentou aumento significativo no número de células infiltradas localizadas no exsudato inflamatório subcutâneo, em comparação aos animais injetados com solução salina. Através da análise biparamétrica (tamanho x granulosidade) por citometria de fluxo foi possível identificar as populações celulares de linfócitos, monócitos e eosinófilos. Os possíveis mecanismos pelo qual o peptídeo da caseína INKKI, induz a migração dessas populações celulares, ainda não estão bem estabelecidos pela literatura.

Outro importante componente na inflamação é o recrutamento de leucócitos na fase aguda da circulação sangüínea para o foco de atividade inflamatória. O primeiro evento observado é a expressão de receptores específicos tanto nas paredes endoteliais como na membrana plasmática dos leucócitos. A partir da vasodilatação ocorre o fenômeno da marginação, onde os leucócitos parecem rolar ao longo da periferia dos vasos, aos quais aderem em seguida com a ajuda das moléculas de adesão. A partir deste ponto, eles migram para o local de inflamação, num fenômeno conhecido como diapedese, através de um gradiente de fatores quimiotáticos, entre eles algumas citocinas, como a IL-8, onde se acumulam no foco inflamatório (SCHUBERT et al., 1989).

Esse importante componente foi demonstrado nos animais tratados com o peptídeo da caseína INKKI. Nossos resultados mostraram que a análise do número de leucócitos totais do sangue periférico mostrou uma significativa redução em todas as concentrações administrados e colhidos após 24 horas.

O pentapeptídeo β -casoquimiotídeo 1 isolado e seqüenciado por Kitazawa et al. (2007) corresponde às cinco primeiras seqüências de aminoácidos do peptídeo da caseína YPVEPFTE, localiza-se na mesma porção da β -caseína bovina e apresenta uma importante atividade na migração celular em macrófagos e monócitos *in vitro*. O peptídeo estudado neste projeto, não apresentou diferença significativa em relação ao controle basal, não induzindo a migração celular para o tecido subcutâneo.

Segundo Kitazawa et al. (2007) o mecanismo de ação da atividade de migração celular está diretamente relacionado com os receptores ligados a proteína G. A ausência da atividade de migração celular apresentada pelo peptídeo da caseína YPVEPFTE, pode estar relacionada com a presença dos 3 (três) últimos resíduos de aminoácidos, que podem estar impedindo o acoplamento do peptídeo da caseína YPVEPFTE aos receptores ligados a proteína G.

A infiltração de leucócitos induzidos por fatores quimioatraentes é um importante evento da defesa do hospedeiro contra invasão de microrganismos ou para o reparo de injúria tecidual. Essa primeira linha de defesa do organismo envolve algumas funções como ativação de integrinas, geração de ânions de superóxidos e liberação do conteúdo granular (KITAZAWA et al., 2007).

As atividades imunomodulatórias desempenhadas pelos peptídeos obtidos pela hidrólise da caseína já descrita pela literatura impulsionaram novos estudos a investigar o papel das proteínas do leite e seus peptídeos na prevenção do câncer, uma vez que o sistema imunológico apresenta uma estreita ligação na etiologia do câncer.

O câncer representa um conjunto de doenças responsáveis pelo óbito de sete milhões de pessoas por ano, ou seja, 12,5% de todas as mortes no mundo. No Brasil, os cânceres estão em segundo lugar como causa de morte geral, correspondendo percentual de 15,1% (Dados obtidos no site da Organização Mundial da Saúde, www.who.int/cancer/en). O câncer de pele é uma das três malignidades mais comuns. Apesar de representar apenas de 4% de todos os tipos de câncer de pele, o estudo do melanoma torna-se muito importante por causa dos altos índices de mortes, em consequência de sua agressividade (GUIMARÃES, 2004).

Os cânceres são considerados doenças a partir de alterações no DNA que podem ser provocadas por diversos eventos. Têm origem monoclonal e com o seu

desenvolvimento e instabilidade gênica, as características adquiridas são passadas para as células filhas, surgindo assim novos clones (COTRAN et al., 2000).

Diferentemente de outras células, as células tumorais são caracterizadas por um crescimento no qual há perda parcial ou total dos mecanismos de controle celular. Esta perda resulta em um crescimento mais acelerado, em comparação as células normais. A velocidade de crescimento celular, ou taxa de crescimento, pode servir como um dos parâmetros em resposta terapêutica a ser empregada. Porém, o emprego exclusivo deste parâmetro não explica a maior sensibilidade das células tumorais, uma vez que há outros fatores como a resistência ao próprio tratamento (genes ativos de resistência a múltiplas drogas - MDR) ou a própria morte celular programada (LEIST; NICOTERA, 1997).

O termo apoptose ou morte celular programada descreve um processo ativo de colapso celular que difere morfológicamente da morte por necrose. É um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas tais como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese, constituindo um mecanismo de remoção de células lesada e de renovação celular e tecidual (LEIST; NICOTERA, 1997).

A falha no mecanismo de acionamento da apoptose conduz provavelmente, a diminuição do menor número de células mortas encontradas em várias patologias como câncer, AIDS, Mal de Alzheimer e artrite reumatóide. A morte celular por necrose, ao contrário da apoptose, ocorre quando uma célula é severamente injuriada, por desastre físico, químico ou pela privação de oxigênio, por exemplo (McGILL et al., 2002).

A morte celular programada pode ser induzida pela ação de vários gatilhos, inclusive pela remoção dos sinais químicos das células (fatores de crescimento ou de sobrevivência). A apoptose também pode ser desencadeada pelos receptores de mensagens internos e externos, que começam a ignorar certos sinais químicos; ou pelos receptores celulares para sinais conflitantes como aqueles que indicam se ela deve ou não sofrer divisão celular, mecanismos de reparo ou pontos de checagem da integridade estrutural e seqüencial do DNA. Essas duas vias de transdução do sinal são classificadas como via intrínseca e extrínseca (McGILL et al., 2002).

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores tais como o controle

genético da apoptose, as caspases como iniciadores e executores de sinal, as proteínas da família Bcl-2, as proteínas inibidoras da apoptose, a proteína p53 e a família dos receptores do Fator de Necrose Tumoral (SARASTE; PULKKI, 2000).

Em alguns tumores, especialmente certos linfomas, a morte da célula é impedida pela excessiva produção de proteína inibidora a Bcl-2, regulada pelas vias de sinalização mitocondrial. Os melanócitos expressam grandes quantidades de Bcl-2, como mecanismo reparador dos efeitos deletérios da luz ultravioleta. As células geralmente morrem por apoptose, freqüentemente pela ativação da p53, por outro lado, a inibição ou supressão de sua expressão produz altos níveis da proteína inibidora Bcl-2, as quais contribuem para a progressão e disseminação (MEIER et al., 1998).

A superfamília dos receptores fatores de necrose tumoral (rTNF) possuem diversos receptores, entre eles o rTNFR-1, Fas/CD95 e TRAIL. A principal característica da família dos receptores fatores de necrose tumoral é um domínio extracelular rico em cisteína. A inativação funcional dos rTNF com domínios de morte pode participar dos processos de tumorigênese, através da via extrínseca da apoptose, ou como elemento regulador do sistema imune (GHOBRIAL et al., 2005).

Levando em conta as necessidades de novas abordagens para a terapêutica do câncer, estudos bioquímicos dos mecanismos de transdução de sinal celular possibilitaram um melhor entendimento da biologia da célula neoplásica. Assim, novos mecanismos de ação estão sendo investigados no desenvolvimento de novos medicamentos para o seu controle. O aparecimento de novos compostos com atividade antitumorais seletivos como alvo para cada capacidade adquirida do comportamento do câncer, e seu uso em combinações apropriadas; associado com tecnologia sofisticada para detectar e identificar todos os estágios da doença pode contribuir na prevenção do desenvolvimento de muitos tumores, ou até mesmo, na cura de tumores pré-existent (MEIER et al., 1998).

Neste trabalho, o peptídeo INKKI (26-30) obtido a partir da hidrólise trípica da β -caseína bovina mostrou-se eficaz “*in vitro*” na capacidade de inibir o crescimento de células de melanoma B16F10, expostas às varias concentrações. Apresentou concentração inibitória 50% de 0,23 μ M avaliada pelo método colorimétrico MTT, método fundamentado na capacidade de enzimas do tipo succinato desidrogenases, presentes na mitocôndria, quando as células viáveis degradam o substrato fornecido pelo reagente MTT (WILSON, 2000). Comparando

sua atividade inibitória “*in vitro*” a outros quimioterápicos, usualmente administrado em pacientes portadores de cânceres, como o paclitaxel, inibidor específico da fase G2/M ou o etoposídeo, inibidor de topoisomerases tipo II, o peptídeo apresentou cerca de 1,5 vezes, mais eficaz em sua atividade inibitória, que as drogas comerciais, demonstrados neste estudo, sem os efeitos colaterais apresentados pelos tratamentos quimio e radioterapêuticos preconizados rotineiramente.

Nossos resultados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE mostraram que não houve correlação significativa com a atividade citotóxica.

O estudo das fases do ciclo celular tem auxiliado na compreensão de vários eventos que controlam a proliferação das células normais e tumorais. No decorrer do ciclo celular podem ser distintas as seguintes fases: G1 (“Gap 1”), intervalo após a mitose durante o qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA (HOWARD; PELC, 1953). Este período é caracterizado pela transcrição gênica e tradução, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA; S período no qual ocorre a duplicação do DNA celular e o G2/M (“Gap 2”) intervalo após a síntese de DNA, durante o qual as células se preparam para a divisão e a mitose propriamente dita.

Resultados das análises genéticas de cânceres humanos têm revelado que proteínas envolvidas no ponto de checagem G0/G1 - S estão inativas na maioria dos casos, e que as modificações no ponto de checagem da ocorrência de danos no DNA parecem ser responsáveis pela resistência das células tumorais a agentes quimioterápicos ou irradiação. Contudo, alterações no ponto de checagem G2/M são encontradas mais raramente (MOLINARI, 2000). Algumas alterações no complexo mecanismo regulatório da transição G0/G1- S, alvo mais freqüente de alterações em câncer, envolvem deleção ou superexpressão de genes ou mutações pontuais que impossibilitam a função gênica, com resultado comum de alteração do balanço fosforilação/desfosforilação, determinando o estado proliferativo da célula (HALL; PETERS, 1996).

O controle da proliferação celular ocorre, sobretudo, na fase G1, e a parada do crescimento de células de mamíferos pode ser finalizada nesta fase, pela depleção de fatores de crescimento ou soro ou em condições de cultura sob alta densidade celular. O estado de parada de crescimento é alternativamente denominado de repouso, G0 ou fase quiescente do ciclo (BARSEGA, 1985). A saída do ciclo celular para um estado de parada de crescimento reversível (G0) é

um processo ativo que envolve a expressão e atividade de produtos de genes de parada de crescimento (COWLED; EVDOKIOU, 1998). Sob estas condições, um programa intrínseco de expressão gênica é induzido e genes envolvidos na parada de crescimento começam a ser altamente expressos. Este quadro de expressão gênica é reversível, por exemplo, fibroblastos em parada de crescimento quando estimulados apresentam regulação negativa dos genes de parada de crescimento (STEBEL et al., 2000).

O tratamento "*in vivo*" de animais portadores de melanoma dorsal B16F10 com o peptídeo da caseína β -bovina INKKI (26-30), na concentração de 2.0 μ M, durante 20 dias, induziu aumento expressivo das células apoptóticas (>81%), quando comparadas ao grupo controle.

As demais fases do ciclo celular obtidas por citometria de fluxo dos tumores dorsais tratados com o peptídeo da β -bovina INKKI (26-30) revelou que o efeito citotóxico é equivalente aos apresentados por drogas quimioterápicas como o Taxol. As fases quiescentes (G0/G1) foram diminuídas significativamente, quando comparadas ao grupo controle.

Na fase S de síntese foi demonstrado que o β -bovina INKKI (26-30) na concentração de 2.0 μ M >95% é equivalente ao quimioterápico comercial Taxol >97%, porém em menor proporção.

O Taxol é um taxano inibidor da polimerização dos microfilamentos envolvidos na formação do fuso equatorial durante a divisão mitótica, o tratamento das células de melanoma B16F10 foi capaz de inibir em média 97% das células na fase G2/M. O tratamento com o peptídeo β -bovina INKKI (26-30) na concentração de 2.0 μ M inibiu 9,8% das células em divisão celular.

O processo da carcinogênese varia dependendo da intensidade e agressividade do agente promotor, convertendo-se em um processo rapidamente progressivo, como ocorre em certos tumores de alta agressividade biológica.

O modelo de melanoma murino B16F10 é o modelo padronizado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI – USA), para a avaliação da atividade antitumoral de novos agentes antineoplásicos.

Nos experimentos de inibição de crescimento tumoral, a partir do 4º dia foram iniciados os tratamentos de cada grupo de animais com seus respectivos esquemas terapêuticos. As curvas de crescimento do tumor indicaram haver diferenças significativas entre os grupos de tratamento com os peptídeos da β -

caseína bovina INKKI e YPVEPFTE, controle – salina e com o quimioterápico paclitaxel. A taxa de redução da carga tumoral foi calculada a partir da média da massa tumoral dos grupos tratados em relação à média do grupo controle, descritos por Plowman et al. (1999).

A eficácia antitumoral de todos os grupos de camundongos que receberam o peptídeo da β -caseína bovina INKKI (26-30) foi refletida nos altos índices de inibição tumoral observados, ultrapassando 78% de inibição tumoral em relação ao controle e de 67% para os quimioterápicos Taxol.

Em camundongos do grupo controle foi nítida a intensa disseminação e agressividade do tumor. Todos os animais deste grupo apresentaram nódulos metastáticos, principalmente distribuídos no pulmão, fígado e linfonodos satélites.

O número de linfonodos comprometidos por metástases é um aspecto crítico do prognóstico. No câncer de mama, por exemplo, a presença de quatro ou mais gânglios axilares ipsilateral comprometidos sem evidência de outras metástases, é interpretada como de pior prognóstico do que a presença de até três gânglios comprometidos. Nos animais do grupo controle foram encontradas presenças de nódulos pulmonares e hepáticos, acima de 30% apresentavam metástases retro abdominais, no mesentério e no peritônio, caracterizando uma intensa disseminação do tumor neste grupo.

A necrópsia dos camundongos tratados com o peptídeo da β -caseína bovina INKKI, macroscopicamente mostrou ausência de neovascularização, anemia, caquexia e as análises histológicas revelaram tumores com baixa densidade celular, aumento de células apoptóticas, núcleos picnóticos, necróticas e em degeneração. Foi observada intensa atividade nos gânglios popliteais drenantes, com o predomínio da proliferação na região periférica rica em centros germinativos, indicando um possível aumento da atividade imunomodulatória específica contra o tumor. Também foi demonstrado o aumento deposição de material fibrilar ao redor da massa tumoral, substituição ou deposição de elementos fibrilares e reticulares da matrix extracelular. Os animais portadores de melanoma tratados com o peptídeo da caseína YPVEPFTE apresentaram grande densidade de células tumorais pleomórficas, citoplasma exibindo pigmento melânico e áreas com vasta irrigação.

A relação entre a infiltração de linfócitos intratumorais e o prognóstico é bem estabelecida para o melanoma, sendo um fator descrito em laudo

anatomopatológico. A presença de linfócitos T (CD8+ ou NK) é considerada um fator prognóstico independente, associado com melhor resposta ao tratamento e melhor sobrevida (ANTONI et al., 2006).

As lâminas histológicas dos animais tratados com o peptídeo da β -caseína INKKI apresentaram discreta presença de infiltrado inflamatório intratumoral. O peptídeo da β -caseína YPVEPFTE não induz a presença de infiltrado inflamatório intratumoral. Esses dados estão em conformidade com a literatura, uma vez que nossos melhores resultados foram obtidos com o peptídeo da β -caseína INKKI que induziu significativamente um infiltrado inflamatório.

As análises hematológicas dos números de glóbulos vermelhos e leucócitos constituem um importante exame de auxílio diagnóstico para doenças hematológicas, sistêmicas e ações farmacológicas ou terapêuticas de várias drogas, principalmente aquelas decorrentes de doenças neoplásicas. As análises são comumente indicadas para avaliação de anemias, neoplasias sistêmicas, reações infecciosas e inflamatórias, acompanhamento de terapias medicamentosas e avaliação de distúrbios plaquetários. Fornecem dados para classificação das anemias de acordo com alterações na forma, tamanho, cor e estrutura das hemácias e conseqüente direcionamento diagnóstico e terapêutico, orienta na diferenciação entre infecções viróticas e bacterianas, parasitoses, inflamações, intoxicações, interações medicamentosas e neoplasias através das contagens globais, diferenciação de leucócitos e avaliação morfológica dos mesmos (LENG et al., 1999).

Pacientes com câncer freqüentemente podem desenvolver anemia. As causas para o aparecimento de um quadro anêmico podem ser atribuídas ao desenvolvimento do próprio tumor ou aos efeitos da quimioterapia (LENG et al., 1999).

Vários tipos de cânceres têm demonstrado aumento na produção de diversas citocinas, incluindo interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (INF- γ), fator transformador de crescimento β (TGF- β) e interleucina 6 (IL-6). Estas citocinas estão envolvidas na retenção de ferro pelo sistema reticuloendotelial, trato gastrointestinal e fígado (LENG et al., 1999). Desta forma, a anemia possui uma estreita correlação com o desenvolvimento e progressão tumoral.

Os peptídeos da β -caseína INKKI e YPVEPFTE alteraram significativamente a quantidade do número de glóbulos vermelhos, nos animais portadores de melanoma. O composto preveniu os quadros anêmicos decorrentes do desenvolvimento, tratamento e da disseminação das células tumorais.

A mielossupressão, decorrente de quimioterapias clássicas mono ou politerapêuticas, podem levar a granulocitopenia e conseqüentes quadros infecciosos sistêmicos graves. Quando são utilizados esquemas terapêuticos de múltiplas drogas, existe um somatório de efeitos colaterais em função da associação. A princípio, nestes casos, a droga é mielotóxica. Fatores de crescimento, por exemplo, a eritropoetina ou os fatores estimuladores de colônias, fator estimulador de colônias do tipo granulócito-monócito (GM-CSF), diminuem a morbidade e a mortalidade por estas complicações (STANFORD et al., 2000).

A imunossupressão que acomete os animais portadores de tumores foi suprimida pela administração do peptídeo da β -caseína PVEPFTE a partir do 14º dia do tratamento.

As plaquetas são originadas da maturação dos megacariócitos na medula óssea. São anucleadas e delimitadas por uma membrana que contém glicoproteínas tais como as integrinas, essenciais para adesão e agregação (NASH et al., 2002).

Camer et al. (2004) mostraram que as plaquetas são importantes para a metástase hematogênica em células de melanoma em modelos de camundongos. A ativação das plaquetas e formação de fibrinogênio é um importante mecanismo pelos quais as células tumorais promovem a metástase.

As plaquetas em pacientes com câncer em estágios mais avançados apresentam aumento na expressão de moléculas de adesão, indicando estado de ativação plaquetária. Tecidos neoplásicos secretam direta ou indiretamente uma série de substâncias potencialmente responsáveis pela ativação da coagulação sanguínea. As células tumorais podem ativar as plaquetas por vários mecanismos tais como o ADP, um potente agonista de ativação, liberado por plaquetas ativadas pelo tumor ou por células tumorais, resultando em agregação plaquetária. A atividade pró-coagulante de alguns tumores, também leva a produção de trombina, outro importante ativador de plaquetas. Outro mecanismo de ativação pode ser desencadeado por contato direto com moléculas presentes na superfície das

células tumorais (NASH et al., 2002). Desta forma, as plaquetas apresentam uma íntima relação com o potencial de metastização da célula tumoral.

O modelo de melanoma murino desenvolvido em nosso trabalho demonstrou essa íntima relação das plaquetas com o potencial de metastização, uma vez que os camundongos portadores de melanoma tratados com solução salina (animais controle) exibiram elevado número de plaquetas no sangue periférico e maior incidência de metástase. Já os camundongos tratados com os peptídeos da β -caseína bovina INKKI e YPVEPFTE reduziram significativamente os números de plaquetas no sangue periférico e redução de 70% no número de metástase.

Desde o surgimento do emprego da quimioterapia para o câncer na década de 40, pós-guerra foram identificados muitos caminhos pelos quais as células cancerosas “escapam” do agente químico. Embora a terapia atual para o câncer dependa principalmente do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação e morte da célula normal e cancerosa proporcionou a descoberta de novos alvos possíveis para o tratamento do câncer. É provável que novas terapias, como no caso dos alimentos funcionais, no caso dos peptídeos da β -caseína INKKI e YPVEPFTE, isolados, purificados e sintetizados pelo nosso grupo, venham a contribuir com as drogas já existentes, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais.

6 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos com os peptídeos hidrolisados da beta caseína bovina INKKI e YPVEPFTE, pode-se concluir que:

- Ambos os peptídeos da caseína induzem significativo aumento da atividade proliferativa em linfócitos T;
- O peptídeo INKKI apresenta atividade quimiotática sobre o infiltrado inflamatório na derme, induzindo efeito migratório de linfócitos, monócitos e eosinófilos;
- O pentapeptídeo INKKI apresenta seletiva atividade citotóxica em culturas de melanoma murino B16F10, com IC50% de 0.23 μ M;
- Ambos os peptídeos não apresentaram atividade proliferativa ou citotóxica em culturas de fibroblastos normais;
- O peptídeo da caseína INKKI inibiu o desenvolvimento tumoral em modelo de melanoma murino em animais da linhagem C57BL/6J, tratados a partir do 4º dia da implantação tumoral.
- Os peptídeos apresentam ação significativa tanto nos experimentos “in vitro” como “in vivo” sugerindo um possível papel fisiológico para estes peptídeos tanto no neonato como possivelmente na mãe.

Referências Bibliográficas

ALONSO S.R. et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. **Am. J. Pathol.**, v.164, p.193-203, 2004.

ANTONI, M.H. et al. The influence of biobehavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 3, p. 240-248, 2006.

BAKER, G.L.; LANDIS, M.W.; HINDS, P.W.: Multiple functions of D-types cyclins can atagonize pRb-mediated suppression of proliferation. **Cell Cycle**, v. 4, p. 330-338, 2005.

BALCH, C.M.; BUZAID, A.C.; SOONG, S.J.: Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J. Clin. Oncol**, v. 19, p. 3635-3648, 2001.

BALL, N.J. et al. Ras mutation in human melanoma: a marker of malignant progression. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, n. 3, p. 285-290, 1994.

BARSEGA R. **The Biology of Cell Reproduction**. Cambridge: Harvard University Press, 1985.

BITTNER, M. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 536-540, 2000.

BONI, R. et al. The PTEN tumor suppressor gene and malignant melanoma. **Melanoma Res.**, v. 8, n. 4, p. 300-302, 1998.

BONINI, A.L.; MOURA, L.A.R.; Franco, M. Revisão: Apoptose em glomerulopatias. **J. Brás. Nefrol.**, v. 22, n. 2, p. 70-77, 2000.

BOYLE, J.L.; HAUPT, H.M.; STERN, J.B.; MULTHAUPT, H.A. Tyrosinase expression in malignant melanoma, esmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 126, p. 816-822, 2002.

BRENTANI, H. et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 23, p. 13418-13423, 2003.

BRODLAND, D.G. The life of a skin cancer. **Mayo Clin. Proc.**, v. 72, n. 5, p. 475-478, 1997.

CAMER E. et al. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 397-401, 2004.

CASTANET, J.; ORTONNE, J. P. Pigmentary changes in aged and photoaged skin. **Arch. Dermatol.**, v. 133, p. 1296-9, 1997.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**. 2^a. ed. Filadélfia: Lippincott-Raven, 1996.

COLEMAN, W.P. et al. Acral lentiginous melanoma. **Arch. Dermatol.**, v. 116, p. 773-776, 1980.

CORNELIS, S. et al. Inflammatory caspases: targets for novel therapies. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 365-383, 2007.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COWLED, P.A.; EVDOKIOU, A. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS 1, in NIH-3T3 fibroblasts. **Exp. Cell. Res.**, v 240, p. 359-367, 1998.

CUCÉ, L.C.; FESTA-NETO, C. **Manual de Dermatologia**. 2^a edição. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

DE SOUZA, R. C. A. **Estudo da cinética celular da resposta inflamatória causada pela crioterapia experimental em pele normal de camundongos utilizando o método de bolsas de ar no subcutâneo**. 2001. 13 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

DONG, J. et al. BRAF oncogenic mutation correlate with progression rather than initiation of human melanoma. **Cancer Res.**, v.63, n. 14, p. 3883-3885.

EDWARDS, J. C.; SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **J. Pathol.**, v. 134, n. 2, p. 147-56, 1981.

ELDER, D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. **Acta Oncol.**, v. 38, p. 535-547, 1999.

ELLISON, D.W.; BEAL, M.F.; MARTIN, J.B. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. **Brain Res.**, v. 417, p. 389-392, 1987.

ELWOOD, J.M.; GALLAGHER, R.P. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun-exposure. **Int. J. Cancer**, v. 78, p. 276-80, 1998.

FADOK, V.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, n. 7, p. 2207-2216, 1992.

FIAT, A.M. et al. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **J. Dairy Sci.**, v.76, n. 1, p. 301-310, 1993.

FIAT, A.M.; JOLLÈS, P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspect. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 87, p. 5-30, 1989.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Ministério da Saúde. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 25 jul. 2008.

GAUCHERON, F. et al. Binding of cations to casein molecules: importance of physicochemical conditions. **Milchwissenschaft Nurnberg**, v. 52, n. 6, p. 322-327, 1997.

GEWIES, A.; GRIMM, S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. **Bros. J. Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1574-1580, 2003.

GIVAN A.L. et al. A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. **J. Immunol. Methods**, v. 19, n. 230, p. 99-112, 1999. Suppl. 1-2.

GHOBRIL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 178-194, 2005.

GOEL, V. et al. Examination of mutation in BRAF, NRAS and PTEN in primary cutaneous melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v.126, p. 154-160, 2006.

GORDEN, A. et al. Analysis of BRAF and N-Ras mutation in metastatic melanoma tissues. **Cancer Res.**, v. 63, n. 4, p. 3955-3957, 2003.

GOURLEY, G.R.; KREAMER, B.L.; COHNEN, M. Inhibition of β -glucuronidase by casein hydrolysate formula. **J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.**, v. 25, p. 267-272, 1997.

GOVERS, et al. Dietary soybean protein compared with casein damages colonic epithelium and stimulates colonic epithelial proliferation in rats. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1709-1713, 1993.

GRICHNIK, J.M. et al. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 111, p. 233-238, 1998.

GULDBERG, P. et al. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. **Cancer Res.**, n.57, p.3660-3663, 1997.

GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**. São Paulo: BBS, 2004.

HAASS, N.K. et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cells Res.**, v. 18, p. 150-159, 2005.

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the β -integrin for a new cancer therapy. **Angew. Chem. Int. Ed. Eng.**, v. 36, p. 1374-1389, 1997.

HATA, I.; UEDA, J.; OTANI, H. Immunostimulatory action of a commercially available casein phosphopeptide preparation, CCP-III, in cell culture. **Milchwissenschaft Nurnberg**, v. 54, n. 1, p. 429-432, 1999.

HENRIQUES, O.B.; de DEUS, N.R.; SANTOS, R.A.S. Bradikinin potentiating peptides isolated from α -casein tryptic hydrolysate. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 182-184, 1987.

HALL, M.; PETERS, G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. **Adv. Cancer Res.**, v. 68, p. 67, 1996.

HAWRYLEWICZ, E.J.; HUANG, H.H.; BLAIR, W.H. Dietary soybean isolate and methionine supplementation affect mammary tumour progression in rats. **J. Nutr.**, v. 121, p. 1693-1698. 2001.

HODGES, S. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. **Modern Pathol.**, v. 15, n. 11, p. 1121-1125, 2002.

HOSONO, A.; SHASHIKANTH, K.; N.; OTANI, H. Antimutagenic activity of whole casein on the pepper-induced mutagenicity of streptomycin-dependent strain SD 510 of *Salmonella typhimurium* TA 98. **J. Dairy Res.**, v. 55, p. 435-442, 1988.

HOWARD, A.; PELC, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. **Heredity**, v. 6, p. 261-273, 1953.

IOZZO, R.V.; EICHSTETTER, I.; DANIELSON, K.G. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. **Cancer Res.**, v. 55, n. 16, p. 3495-3499, 1995.

JANEWAY, C.A. et al. **Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença**. 4. Ed. São Paulo: Artmed, 2000.

JI-HYUN, C.; CHARIS, E. Nuclear-citoplasmatic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. **Cancer Res.**, v. 65, n. 18, p. 8096-8100, 2005.

JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 18, p. 345-357, 1999.

JUNQUEIRA C.U.; JUNQUEIRA L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1993.

KANNAN, K. et al. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 3, p. 1224-1225.

KAWAHARA, T.; KATAYAMA, D.; OTANI, H. Effect of β -casein (1-28) on proliferative responses and secretory functions of human immunocompetent cell lines. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n. 10, p. 2091-2095, 2004.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-57, 1972.

KITAZAWA, H. et al. Enzymatic digestion of the milk protein β -casein releases potent chemotactic peptide (s) for monocytes and macrophages. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 1150-1159, 2007.

KITTS, D.D. Biactive substances in food: identification and potencial uses. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 72, n. 4, p. 423-434, 1994.

KOWALSKI, L.P. et al. Long-term survival rates in young patients with thyroid carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, v. 129, n. 7, p. 746-9, 2003.

KROWN, S.E.; CHAPMAN, P.B. Defining adequate surgery for primary melanoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 823- 825, 2004.

KUMOSINSKI, T.F. et al. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: An energy-minimized β -casein structure. **J. Dairy**, v. 76, n. 4, p. 931-945, 1993.

KUBRUSLY, M.S. et al. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a Brazilian casuistic. **J. Pancreas**, v. 3, n. 5, p. 144-151, 2002.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immustimulating casein-derived substances from milk casecedin, isracidin peptides. **Food Chem. Toxicol.**, v.34, n. 1, p. 131-145, 1996.

LEBRUN, I. et al. Effects of 'casoparan', a peptide isolated from casein hydrolysates with mastoparan-like properties. **Mediators Inflamm.**, v.13, n. 4, p. 263-268, 2004.

LEBRUN, I. et al. Isolation and characterization of a new bradykinin potentiating octapeptide from gama-casein. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, n. 1, p. 85-91, 1995.

LeBLANC, J.;G. et al. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2733-2742, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Principios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Savier, 2000.

LEIST, M.; NICOTERA, P. The shape of cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 9, p.1-9, 1997.

LENG, H.M.J. et al. Erythropoietin production in anemia associated with experimental cancer. **Exp. Hematol.**, v. 27, p. 806-810, 1999.

MACKIE, R.M.; HOLE, D.J. Incidence and thickness of primary tumours and survival of patients with cutaneous malignant melanoma in relation to socioeconomic status. **BMJ**, v. 312, p. 1125-1128, 1996.

MCGILL, G.G. et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. **Cell**, v. 109, p. 707-718, 2002.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues, and disease: principles of general pathology**. Cambridge, Mass.: Blackwell Science, 1996.

MANGINI, J.; LI, N.; BHAWAN, J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. **Am. J. Dermatopathol.**, v. 24, n. 3, p. 270-81, 2002.

MARUYAMA, S.; SUZUKI, H. A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. **Agric. Biol. Chem.**, v. 46, n. 5, p. 1393-1394, 1982.

MEIER, F. et al. Molecular events in melanoma development and progression. **Front Biosci.**, v.15, p 1005 -1010, 1998.

MEISEL, H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. **Biopolymers**, v. 43, p. 119-128, 1997.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 363-373, 1998.

MÉLISSOPOULOS, C.L.; LEVACHER, C. **La peau: Structure et physiologie**. Paris: Éditions Médicales Internationales, 1998.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Prolif.**, v. 33, p. 261-274, 2000.

MOTOKURA, T.; ARNOLD A. Cyclins and oncogenesis. **Biochemical and Biophysics Acta**, v. 1155, p. 63-78, 1993.

MULLER, H. et al. Cyclins D1 expression is regulated by the retinoblastoma proteins. **Proc. Natl. Acta Sci. U. S. A.**, v. 91, p. 2945-2949, 1994.

MUTANEN, N.; PAJARI, A.M.; OIKARINEN, S.I. Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in APC^{min} mice: relation to β -casein and PKC isozymes. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1167-1173, 2000.

NASH, G.F.; WALSH, D.C.; KAKKAR, A.K. The role of coagulation system in tumour angiogenesis. **Lancet Oncol.**, v. 2, p. 608-613, 2001.

NOONAN, F.P. et al. Neonatal sunburn and melanoma in mice. **Nature**, v. 413, n. 6853, p. 271-272.

OTANI, H.; WATANABE, T.; TASHIRO, Y. Effects of bovine β -casein (1-28) and its chemically synthesized partial fragments on proliferative responses and immunoglobulin production in mouse spleen cell culture. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, n. 11, p. 2489-2495, 2001.

PARODI, P.; W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Curr. Pharmaceut. Design**, v. 13, p. 813-828, 2007.

PAULOVICH, A.G.; TOCZYSKI, D.P.; HARTWELL, L.H. When checkpoints fail. **Cell**, v. 83, p. 315-21, 1997.

PETER, M.E.; HEUFELDER, A.E.; HENGARTNER, M.O. Advances in apoptosis research: **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 12736-12737, 1997.

PLOWMAN, P.N.; COSTELLO, J.; O'DONOGHUE, N. Complete remission of extensive metastatic renal cancer following immunotherapy. **Clin. Oncol.**, v. 9, p. 176-80, 1997.

POLSKY, D. et al. The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas. **Cancer Res.**, v. 61, n. 16, p. 6008-6011, 2001.

POMERANTZ, J. et al. The INK4a tumor suppressor gene product, p19ArF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 713-723.

RAMIREZ, J. A. et al. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. **Ann. Diagn. Pathol.**, v. 9, p. 185-188.

REIFENBERG, J. et al. Allelic losses on chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas. **Virchows Arch.**, v. 436, n. 5, p. 487-499, 2000.

RICHTER, R. et al. Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. **J. Chromatogr. B.**, v. 726, p. 25-35, 1999.

ROBERTS, P.R.; ZALOGA, G.P. Dietary bioactive peptides. **New Horiz.**, v. 2, n. 2, p. 237-243, 1994.

RUITER, D.; VAN MUIJEN, G. P. Markers of melanocytic tumor progression. **J. Pathol.**, n. 186, p. 340-342, 1998.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Res. Cardiovasc.**, v. 45, p. 528-537, 2000.

SCHLIMME, E.; MEISEL, H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. **Nahrung**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 1995.

SCHUBERT, C. et al. Transendothelial cell diapedesis of neutrophils in inflamed human skin. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 281, n. 7, p. 475-81, 1989.

SHARMA, S.; WAGH, S.; GOVINDARAJAN, R. Melanosomal proteins role in melanin polymerization. **Pigment Res.**, v. 15, n. 2, p. 127-33, 2002.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinase. **Genes Dev.**, v. 9, n. 10, p. 1149-1153, 1995.

SLOMINSKI, A.; ROSS, J.; MIHM, M., C. Cutaneous melanoma: pathology, relevant prognostic indicators and progression. **Br. Med. Bull.**, v. 51, p. 548-69, 1995.

STANFORD, S.J.; PEPPER, J.R. Release of GM-CSF and G-CSF by human arterial and venous smooth cells: differential regulation by COX-2. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 835-838, 2000.

STEBEL, M. et al. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. **FEBS Lett.**, v. 481, p. 152-158. 2000.

STRAUME, O. et al. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 1, p. 229-37, 2002.

TANG, A. et al. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. **J. Cell Sci.**, n.107, p. 983-992, 1994.

TSAO, H.; MIHM, M.C.; SHEEHAN, B.S. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.49, n.5, p. 865-872, 2003.

TUCKER, G. C. Inhibitors of integrins. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 2, n. 4, p. 394-402, 2002.

VALYI-NAGY, I.T. et al. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. **Lab. Invest.**, v.69, n.2, p.152-159, 1993.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, n 4, p. 214-223, 2002.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, n. 3, p. 131-49, 2003.

XIONG, J. P. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin β -3. **Science**, v. 294, n. 5541, p. 339-345, 2001.

WARD, L.S. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. **Rev. Bras. Clin. Terap**, v. 26, p. 103-107, 2000.

WALDMANN, V. et al. Pathogenesis of malignant melanoma: Molecular biology aspect. **Hautarzt**, v. 50, n. 6, p. 398-405, 1999.

WEERARATA, A.T. et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. **Cancer Cell**, v. 1, n. 3, p. 279-288, 2002.

WILSON, A.P. **Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Wheather histologia functional: Texto e atlas em cores**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ZANG, F.M.; OTANI, H. Immunogenicity and antigenicity of casein phosphopeptides. **Milchwissenschaft Nurnberg**, v. 58, p. 9-13, 2003.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1, n. 1551, p. 1-37, 2001. Suppl. 2.