UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JOSÉ EMILIO FEHR PEREIRA LOPES

**EFEITO ANTIANGIOGÊNICO DO METIL JASMONATO, PURO OU
NANOCARREADO, UM NOVO MECANISMO PARA SUA AÇÃO
ANTINEOPLÁSICA E ANTIMETASTÁTICA.**

SÃO CARLOS
2009

JOSÉ EMILIO FEHR PEREIRA LOPES

**EFEITO ANTIANGIOGÊNICO DO METIL JASMONATO, PURO OU
NANOCARREADO, UM NOVO MECANISMO PARA SUA AÇÃO
ANTINEOPLÁSICA E ANTIMETASTÁTICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes.

SÃO CARLOS

2009

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lopes, José Emílio Fehr Pereira.

Efeito antiangiogênico do metil jasmonato, puro ou nanocarreado, um novo mecanismo para sua ação antineoplástica e antimetastática / José Emílio Fehr Pereira Lopes ; orientadora Lígia Ferreira Gomes.—São Carlos, 2009.

226 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Metil Jasmonato. 2. Nanocarreadores. 3. Angiogênese. 4. Antiangiogênese. 5. Cancer. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Emilio Fehr Pereira Lopes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovado em: 05/06/2009

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes

Instituição: FCF/USP

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

Instituição: UFPR

Assinatura

Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Instituição: FMRP/USP

Assinatura

Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza

Instituição: FMRP/USP

Assinatura

Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

Instituição: UNIFESP

Assinatura

Dedicatória

To Eliezer:

My Tutor, each man should frame life so that at some future hour fact and his dreaming meet. Any life devoted to the discovery of a cure, for mankind, shall never kill any dream we dreamed.

Thank you for being at my side, always!

Agradecimentos

A Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes.

Se o passado confere perspectivas ao oscilante e frágil julgamento dos homens. Viver é conviver e, neste terrível jogo de atrações e repulsas de que a vida é feita, não é apenas difícil, mas totalmente impossível, deixar de comprometer-se, ao julgar as realizações do semelhante com as medidas dos próprios valores. Ora amigos, a axiologia não é, nada mais, nada menos, do que um ramo da, hoje, chamada psicologia comportamental. Postulamos valores segundo o nosso feito constitucional: muito mais poderosos do que o educacional ou meramente social. A grande, a extraordinária singularidade das atividades acadêmicas, é esta: a de permitir, àquele a quem se apresenta ao mundo científico, balancear, com a total isenção que o tempo confere a vida e a obra do que foi, do que é e doravante, do que se consagra. Premia-se uma promessa em transito, um esforço em pleno exercício. Concedem-se generosos créditos a uma tarefa inacabada. Mas em compensação, também permite um juízo, tão próximo quanto possível, da obra realizada pelos que nos antecederam na mesma luta sem tréguas pelo semelhante, na pesquisa da mesma verdade ou verdades que a ciência de compõe. E se a ciência pode ser conceituada como um sistema de conhecimentos experimentais destinados aclarar certo e determinado objeto de conhecimento, a própria vida é a ciência. E saber vivê-la é a glória dos santos, dos artistas, dos sábios e dos heróis, isto é, daqueles que souberam cumprir o seu destino, sem falhar à linha da sua predestinação.

Esta coerência, esse não desmentido ao ser total, é que confere ao homem a grandeza em todas as dimensões. Claude Bernard, disse: “grande sábio e pobre homem”. Pobres grandes homens são todos aqueles que, por um concurso de causas que só Deus conhece, não puderam ser o que quiseram ou não atingiram o que queriam. Porque não basta a realização de um ou vários sentidos de personalidade para, que nos tornemos dignos de ambicionado epíteto. Poucos, raros logram esse equilíbrio, com que, afinal de contas, foram agraciados, se não pertence apenas ao livre arbítrio o domínio das paixões e o império totalizador, mas da ajuda do céu!

Confessio Fraternitatis Verba et voces praeterea que nihil

Carta Fraterna; sobre as palavras e vozes e nada mais.

Já se faz longe as memórias aonde cheguei nesta Egrégia Casa, ainda saindo da Faculdade de Direito, dava-me a sensação de estar somente movendo-me aos períodos adiante, em rito velocidade adiantados, rumando-me para uma graduação, como já havia feito no curso de medicina. A escola sempre me nutriu com um grande desafio, uma prazerosa tarefa de conhecimento e conquistas. Crescido, a fome de saber me consome. Tal prazer soube atender os chamamentos da minha curiosidade para entender a importância da universidade, da sua história e o seu papel real, frente à formação de grandes mestres. Resultante a esta inclinação indagativa, aprofundei para dentro do universo da minha alma, travando buscas para minhas questões, como retiro voluntário no encontro solidário e honroso com a minha momentânea solidão, levei-me referenciar, um sumo conceito, os homens que anteviram esta relevância, para um futuro consequente. E o que me coube, foi reafirmar o orgulho concluso e historiar, de forma particular e íntima, a criação da Universidade Federal de São Carlos. Há pessoas que semeiam frágeis sementes, que virarão frondosos carvalhos. Projetam os inúmeros proveitos que esta árvore poderá render, sabendo que não irão vê-la crescida, afinal, seus passos são naturalmente mais limitados que os da juventude que haverá de usufruir o frescor de sua sobra. Somente se imbui de tal ofício, o homem que desconhece o egoísmo e atira a sua frente a fé temporal, de hoje, amanhã, a lança para o futuro. Eis tal homem, que serviu como referência dorsal para a minha vida, Ernesto Pereira Lopes. O nascimento da Fundação Nacional do Meio Ambiente proporcionou a mim, um quadro mais palatável de observação da importância de educar e planejar o futuro e cidadania. Lembro-me da história do curso que originou a UFSCar, o então moderno e popularmente desconhecido, o curso de Engenharia de Materiais, cujas reminiscências da história, são contadas com maestria pela pilastra mestra deste ideal, Professores Sergio Mascarenhas e José Galizia Tundisi.

Meus Avós, médicos, e minha Avó Jurandira Fehr, me hão ensinado com o vosso exemplo que o caminho da liberdade reside nos sentimentos, essência viva da alma. Ao invés de aquilatar suas obras, percebo que ajuizaram e dividiram seu espírito desperto, que não se perdeu na agudeza pela abundância. Procuras por estes beneméritos no dia de hoje? Desvias vossos olhos, abstraia-se do olhar exato, faça a sua visão curvar-se dos que hoje, somente

buscam a luz fugaz, como projeção pessoal e dispersa, na profecia política, que caia para o esmo a arte de educar; objetivado somente no sucesso pessoal A luz projeta, veloz carrega consigo, as memórias desenhadas na imagem virtual, que se encerram quando esta mesma luz se apaga; nada deixam para ser lembrado. O que fazes para edificar sua passagem volátil e branda chamada vida, preparando o chão aos que virão iluminar, inevitavelmente, sobre as nossas sombras, como toda história natural do homem que a cada geração renasce?

Ernesto Pereira Lopes, este avô e mentor, me plantou a árvore, cujo leite cavado, sem licença foi em meu peito, ato sem perdão. Afinal o perdão na juventude cai na resistência de nunca depor as armas que imperam na rebeldia. Incluiu a semente desconhecida, e temente frente não saber o que havia no núcleo germinativo plantado e prometido. Disse que cumpriria o seu desejo de me ver na pesquisa, e daquele desejo, previamente advindo de forma unilateral, hoje nasceu e frutificou minha razão e verdadeira vocação. Esta árvore perdura e se fez grande. Da frondosa sombra, era profético e fato, ele não fez o seu usufruto, soube deixar sua dádiva para encorajar outros tantos, poucos reagem, transcendendo-se a cada objetivo individual. E agora, vejo-me no mais alto degrau da discência, frente ao curso modernizado pelo meu Avô, em pé graduo-me em outra Instituição que, também, abraçou meu chão natal, a Universidade de São Paulo. Procuro nas multidões, as palavras que meu mestre e amigo, proferiu com firmeza, tantas vezes, buscando seus ideais, voltados a comunidade como um todo. Grito para que o possa achá-lo, e retribuir o carinho de filho. Busco..., mas ouço o silêncio; somente o desconfortável silêncio. Procuro sua voz. Percebo que mesmo estando postado no alto andor da Universidade, o olhar ainda se faz de forma tímida, para enxergar a imensidão onde, hoje, habitas. Murmuro na vã tentativa, outro firme pedestal de nome Emilio Fehr! Sem resposta, encorajo-me e rogo: Vibras Avô Emílio, pois sei que o alcance máximo de toda conquista de conhecimento, sabe compartilhar, se mudo ainda se fizer, recebo seu abraço meu Avô, nos acordes em vigília; Nessun Dorma, no arpejo vocal do mais alto tenor que entre notas traz a essência das palavras, e as palavras brindariam sua alegria. Replico neste brinde os seus versos finais: *Desvaneça, ó noite!Desapareçam, estrelas!Desapareçam, estrelas!Pela manhã vencerei!Vencerei! Vencerei!*

Partidas cedo não nos permitem conhecer a beleza madura que se faz entre um Avô e neto. Mas a passagem dos anos me faz compreender a altitude que habita ainda inúmeras almas. Aqueles que partiram, soprando em sussurro a esperança na ciência para que abandassem os seus sofrimentos Elevo-me as mãos em prece, e meus olhos para o alto, para que encontremos nossos olhares, no infinito que nunca se vai, vaga-se para o eterno, e recebam esta tamanha alegria. A Ciência não amargou a ternura, como pedem alguns, que surdos e refugiados de

sentimentos, nunca ouviram as vozes de seus silêncios. Pobres homens que desconhecem a emoção! Pueris os que desdenham os que sensibilizam com a magia da ciência. Se incapazes fores de abraçar suas emoções, critiquem a si mesmo, assim será de fato um cientista, pois, antes do ensaio, experimentarão o respeito os alheios. Reveja as escritas de sua vida, objetive o melhor para o próximo, materiais são os métodos generosos, cujas ferramentas, tratarão da compreensão e do não sofrer. Os resultados serão descritos na discussão da vida, e a conclusão será encerrada, no momento do escurecer de seus olhos

Escrevo, neste prólogo, avisado que sentimento não cabe em uma tese. Enganos dos desavisados, ícone da genialidade Albert Einstein retumbava em dizer: A mais nobre ciência é dizer e escrever o que sinto. Mais eis que a literatura descortina tal tese imortalizada: "Sentir é criar. Sentir é pensar sem idéias, e por isso sentir é compreender, visto que o universo não tem idéias. Se escrevo o que sinto é porque assim diminuo a febre de sentir. O que confesso não tem importância, pois nada tem importância. Faço paisagens com o que sinto. Às vezes ouço passar o vento; e só de ouvir o vento passar, vale a pena ter nascido. Todos temos por onde sermos desprezíveis. Cada um de nós traz consigo ato feito ou desejo que a alma lhe pede para fazer. A ciência descreve as coisas como são; a arte, como são sentidas, como se sente que são."

Movido por tal euforia, subo neste degrau para falar tão alto, nunca falei tão longe, porque falo do ápice da vossa generosidade, meus fraternos e amigos, para o mundo amplo e imortal, desta Academia, dirigido para o infinito de seus e tantos outros sentimentos. Grande alegria do homem, em todos os tempos e em todos os lugares, é sentir que o carinho de todos vocês, permaneceu comigo, neste caminho. Olhem para mim, como um homem grato e descansado pelo acalanto de vossos braços! Para mim se afigura um sonho receber da mais elevada e nobre instituição de ensino brasileiro, tão alto título, que finaliza a lição de casa. Os revezes do tempo, da política oclusa e cirrótica, desenhou propositalmente a desonra de inúmeros destinos, por meros acasos pessoais, de cunho não apropriados a citação, por hora festiva. Os talentos que foram ceifados por incabíveis e traçadas transações. Observar o assassinato moral dos que evoluíram, executados pela arma dos olhos dos muitos que se afligem e sentem com a fome imperativa de se ver acima dos demais, definindo como metas da vida todos absurdos, na tentativa de forjar o descrédito de imaginários competidores. Cravar em madeira deteriorante suas leis, ocultando as suas realidades quando os seus méritos são inexistentes. Há ingratos por egoísmo, ingratos por cálculos, ingratos por conveniências, ingratos por inconsciência e ingratos por necessidade biológica se serem ingratos. Este último, é o Brutus inato, é o infame incorrigível, é o pior de todos. Traz no plasma o destino do mal e revive a

célebre imprecação romana: *Tu quoque, Tu quoque fili mii. Até você, Brutus? Até você meu filho?* Estes sorriem a você esmerando o desejo de sorte, e na sua sorradeira ausência, destroem as suas chances de nascerem grande dentro de uma instituição, pois temem o medo do fogo imaginário vindo do potencial da sua desconhecida luz ser apagada. Para o arrepio da ignorância deste grupo, as suas fraquezas vêm a tona, nos olhos de todos, que mesmo sem proferir publicamente, já os conhecem!

Fez me pensar de forma errante em subtrair-me de ousar a chegar nesta inestimável honra, mas, no silêncio da meditação, ponderei que se era uma das que não devem ser solicitadas era, também, das que, por desprimoroso, não podem e não devem ser recusadas. As palhas da árvore inclusa em meu peito outrora, com a força flexível de seus galhos, me lançavam para cima, e do alto, muito além das pás movimentadas dos moinhos, vi as luzes em carreata, chegando para fazer da noite, o meu dia. Ainda, lá de cima, revi o aprendizado: a vida me ensinou que há gestos que valem mais e são mais eloqüentes do que as palavras. A expressibilidade da linguagem mímica supera à do verbo. Não há retórica nem eloquência que iguale todo sentimento contido no gesto da mãe que eleva o braço para abençoar seu filho: quanta ternura, quanto carinho, quanto amor, neste singelo gesto maternal.

Fácil me não é, neste momento, confessar os momentos de dúvida ao me rebelar com a vaidade que preenche os escombros desconhecidos da humanidade. Compor as lacunas vazias, morte ao encanto, de redundância necessária, comum do imaginário infantil, que me fazia vislumbrar este mundo real, e diferente do lado de fora destes muros, que ilhava este Campus mágico, durante o meu crescer nestas redondezas. Idealizar a Universidade como reunião egrégia de homens e mulheres cujas genialidades estavam acima do substrato moral, livres dos sentimentos pequenos, comumente derivados de lentidões das mentes irracionais.

Meus Pais, Jose Carlos e Sonia, fizeram-me forte sobre tudo, destruindo os obstáculos dos ímpios, dado o amor e a compreensão advinda da sua natureza forte e desenhada a cada dia, na vida em nosso lar. Meus Irmãos Valéria e Ernesto, Sandra e Fernando, João Eduardo e Maria Cristina, proclamaram as virtudes desta união. O amor de cada um, tecido artesanalmente, de formas diferentes, atribui de forma verdadeira, levando a esperança quando há silêncio, e risos quando faltam os momentos de ternura. Nasce a força de uma família com tais pilares. Tornaram-me vidente para entender os fragmentos da vida, valorizá-los, sobre tudo, todos os profissionais que confeccionaram a minha carreira profissional. Vanderlei Bagnatto e Antonio Aprígio da Silva Curvelo, filósofos e polêmicos, seduzidos pelo amor da humanidade e ao ensino interativo e de percepção, obstinados vieram inculcar uma época em que a mente livre de muitos de seus alunos, não compreendia. Seus

ensinamentos, acompanhando o progresso da civilização, por si só, seriam bastante para levar o homem aprendiz, ao cumprimento de seus deveres. Mas há alunos que traçam seus caminhos por si, de forma única, levando o nobre nome de seus tutores, reconhecendo o mérito inquebrantável de cada um, e entendendo que esta amizade esta vinculada sempre ao princípio da finalidade que preside a batalha dos opostos, vida e morte, brancos e pretos, dia e noite, prêmio e castigo. Um não pode existir sem o outro. Assim um não existe sem o outro. O prêmio e castigo como antitético se excluem. O castigo é punição, condição terrível que martiriza humilha e degrada quem o sofre, consterna e compunge quem o dá e contrista quem o vê, e, pelo contrário, o prêmio exalta e enobrece quem o recebe, lisonjeia e engrandece quem o dá, alegra e encoraja quem o vê e até mesmo, a quem tem notícia, de seus sucessos, meus amigos, ainda que de longe. Vocês foram os opostos, necessários, hoje, deste júbilo. Os olhos externos julgam nossas parcerias, rotulando nossos resultados e relações entre o bem e o mal, como o prêmio e o castigo, são inerentes à natureza humana, e, por isto são e hão de ser, sempre, condições indispensáveis para prover um ou evitar o outro. A história esta escrita. Fizemos estas mesmas histórias, reais, dando à gênese às tantas lembranças e perseverança do proferimento da palavra saudade. Não se vive no vácuo e o que a natureza dá e só a sepultura tira. Claudio José Lopes, Marcio Ribeiro Barbosa, Fabio Barbalho Leite e Márcia Lemos, estes meus prêmios e nenhum castigo. Estou, hoje, aqui. O embaraço me faz ardente para agradecer-vos, um a um, com o calor da sinceridade e do fervor do reconhecimento, a tão carinhosa e, sobretudo, honrosa prova, de que vocês persistem sobre a sobra turva do pequeno grupo que desonra o altruísmo da ciência.

A palavra escrita, a mais transcendente expressão do pensamento, imortalizada, não exprime fiel e convincentemente o conteúdo afetivo que meu grato momento encerra. A palavra apenas reveste o pensamento, sem significar, entretanto, suas reações de conotação agradável ou penosa. Duas palavras podem conter pensamentos idênticos gerados por um mesmo ato ou fato. Nunca, porem, eles são sentidos igualmente na sua essência. Até aqueles que convivem com os segredos e a magia das palavras conseguem transmitir, com fidelidade, o conteúdo afetivo de um sentimento. As idéias são universais e os sentimentos são peculiares a cada um. Meus tios Marilena e Raimundo Barbosa, que estiveram codificando sentimentos reais a cada situação carecida provocando neologismos, perduráveis como riquezas de minhas memórias. As palavras são ouvidas, quando fortes pedem o silêncio aos que as ouvem Estas pessoas que se tornam submissas às suas idéias, são os que acreditam em suas grandezas.

Se a palavra é sublime e só não é soberana porque não pode prescindir da benevolência do auditório que a consagra ou a repudia. Obrigado pelo apoio durante os gritos de euforia

empíricos. A gratidão se faz como arte. Sendo ela a mais bela e expressiva de todas as formas artísticas, jamais pode expressar, pelo verbo, a ressonância afetiva contida em um sentimento. Quisera, por isso, meus caros amigos, que minhas palavras nesta dedicatória, sejam elas sem brilho, porem cálidas de afetos, confinadas agora, nesta leitura, e Oxalá, em cada um de seus corações. Sejam elas acolhidas, na simplicidade e, com a sinceridade com que são escritas. O que, sobretudo, me conforta é sentir o eco carinhoso que este evento despertou no seio da sociedade que construiu esta egrégia casa, Professor José Galizia Tundisi e Professora Takako, souberam fazer-me entender o que seria persistir dentro da Universidade, sem definir as minhas características, como viveram e deixaram sua marca, sem a necessidade de padronização de vestes ornamentais de quem não veste a realidade. A chuva lava fantasia, e a verdade trazida com a água afrouxa-a expondo a realidade, a vergonha temida e indevidamente oculta. Vocês “Senhores das Águas” orientaram a vertente deste trabalho, dividindo de forma conjunta, adicionando, ensinando e conjugando, com maestria, o verbo educar!

Não se faz mister venha dizer-vos que eu conheço o verdadeiro sentido desta defesa desta tese, o ato protocolar que leva mais em conta o tempo de longevidade dos parcos méritos, da persistência e do estudo ilimitado. Mas a esfuziante ainda, além da chegada ao título grandioso que norteou-me, desde minha infância como sendo o ponto mais alto de sabedoria de um homem, foi entender que os estudos se fizeram muito além dos olhos fixados em meras paginas de livros, mas resultante da união de forças de pessoas de gestos patentes de generosidade. A generosidade é sempre grande; nela cabem todas as virtudes. É forte por si mesma e por si mesma se realça. Os seres que fazem tal sentimento habitar em seus corações faz suas vidas crescerem, pois dentro de si mesmos, a generosidade, cresce e realça. Somente ela é digna do culto daqueles que enobrecem a existência, todos os funcionários que mesmo desconhecendo seus nomes, definiram que a generosidade e a gratidão andam entrelaçadas; são gêmeas e se embebem na mesma fonte de afetividade. Acode-me ainda mais agora, que deixo um trabalho que será imortalizado nas prateleiras, descanso para os anais desta Egrégia Universidade. Nela, traçada em pergaminho moderno, celulose alva, as palavras descrevem os efeitos nascidos de um sonho. Vejo a defesa de tese como uma homenagem á Ciência, onde se dignifica se eleva, e comove aqueles que participam do ambiente de cordialidade. Porem, bem sabe, que toda natureza de sua natureza de forma amistosa é pródiga e pó, isso mesmo impõe restrições interperativas.

Amigos, findada este livro, o titulo me oferece tratar-se como cientista, cabe considerar a vetusta afirmação que o homem é a medida de todas as coisas. Na verdade a medida

insubstituível de tudo o que existe..., material ou espiritualmente, desde as formas mais singelas às mais maravilhosamente complexas manifestações da natureza. Tudo se origina se renova, se perpetua, ou morre ao longo do tempo em fim. No concerto ecumênico do que existe que sejam coisas inanimadas ou seres vivos, é pelo tempo que se mede a marcha de todos os fenômenos. Nenhum ser ou coisa pode isolar-se dessa cadeia temporal inacabável porque o equilíbrio de cada um se mantém a custas das transformações continua cuja essência é o movimento e movimento se mede pelo tempo.

Parte integrante do Cosmos, cada elemento traz consigo a marca da engrenagem do tempo. Amigos que nos atingem constituindo nosso tempo ou vida de grandes riquezas. Marina e Beatriz, minhas filhas na fé, Fernando, Eduardo, Vitor, Maria Eduarda e Bernardo, sucedem cada momento de alegria, imortal. Virão depois de todos nós, formando gerações futuras. Portadores de afeto generoso trazem em sua genética a forma de multiplicar o verbo amar. Mesmo sabendo que gerações surgem e desaparecem rolando como ondas na imutabilidade do tempo, assim como as coisas se sucedem no rolar fatal dos séculos. A própria vida humana se regula pelo tempo.

Existir é durar, é permanecer no tempo. Sem menoscabo ao postulado metafísico da existência de suas polaridades, funcionais e correlatas, o espírito e a matéria, e sem negra ou castigante presença de um Deus, barroco e obscuro em nós, a vida como se fora uma força, poderia ser definida como um conjunto de adequadas estruturas orgânicas e de harmônicas reações bioquímicas que geram energia, cuja temporalidade é limitada. Antes mesmo de vir à luz o ser humano, perfectível ou imperfectivelmente, se vai consumindo ou perdendo sua dimensão temporal. Cada instante que vive o aproxima de seu fim... Vida é momento e movimento, e o movimento é tempo. A vida é um continuo passar do futuro para o passado. Os instantes de um e do outro, se sucedem, sem lapso e sem interrupção de tal modo que, quando termina um começa o outro. Não há assim, o mais ínfimo espaço temporal para conter o que se denomina tempo presente. E nossa consciência precisa de demarcações evidentes para separar as coisas, a fim de tornar possível o raciocínio. É bem de ver que se o presente não compartilha da unidade do tempo, convém corrigir esta noção conceptual, ascendendo do conhecimento aparente ao conhecimento real. O tempo não existe por si mesmo, pois é produto de nossa consciência, e, como foi construído através da razão e da imaginação, garante a qualidade gloriosa do espírito humano. É curioso que na concepção do tempo se venha representando um movimento uniforme e nele se venha, mentalmente, colocando as sucessivas datas dos conhecimentos de acordo com nossas necessidades cotidianas. Das pessoas que passam por este fragmento, cumprindo sua porção que registra a sua história neste mesmo trabalho. Maria

Gabriela, na busca de respostas para si proporcionou o incentivo de sua maneira, participando com alegria os êxitos de conquistas deste trabalho, sua companhia como mulher, fez-se colimada ao meu movimento cíclico, a oscilação do tempo não pode deixá-la esquecida. Meus segundos Pais, Jane, Arthur Factor e meu irmão Steven, o limite da distancia não barrou o movimento, sobre o tempo. Vocês vivem junto de mim, como as equações relativas da energia e do tempo, me levasse junto de vocês, na vibração harmônica do meu coração! Eis que, a verdade constitui uma ilusão, supor que o tempo passa, que o tempo corre. O tempo não passa, é imóvel. Nós é que passamos. O tempo que existe em nossa consciência não é o tempo tal como existe na realidade. É um tempo subjetivo, psicológico e não real. Futuro e passado são simples convenções do homem para propiciar a compreensão dos fenômenos. Por ser subjetivo, é variável. Existe para cada um de nós. Nestes movimentos da vida unimos a pessoas, dentro as quais me mantenho em pé, pela força conjunta de tantas mãos amigas, destes que sincronizamos nossas passagens e movimentos no caminho por este mundo. Juntos estamos, e construímos uma história. O futuro acontece para uns indivíduos, mas para outros não. Alguns seres nele penetram centenas de anos, ao passo que outros o descortinam apenas alguns segundos. Somente o homem tem a concepção do tempo abstrato. Só a consciência humana, que criou o tempo, tem o poder de abstração que lhe permite apreciar a duração do ontem e do amanhã: do passado, lembranças, do futuro, esperanças. A vida se desenrola no tempo e é medida em minutos, horas, semana, meses e anos. O que denominamos idade nada mais é do que o consumo do tempo. A duração da vida humana tem sido preocupação constante... A gerontologia nasceu quando morreu o primeiro ser humano e surgiu a preocupação com a morte. A duração máxima da vida humana está determinada e codificada no genoma humano em torno de 120 anos. O genoma humano com seus três bilhões de pares de bases do DNA criou um novo período da humanidade, com auspiciosos benefícios no campo da medicina preventiva com impacto social. Na era pós genômica, a qualidade de vida humana será melhor e mais saudável. As perspectivas de duração da vida dos idosos se ampliarão. As doenças genéticas ou degenerativas, como o câncer, o diabetes, a hipertensão arterial, a Doença de Alzheimer, a artrite reumatóide, a esclerose lateral amiotrófica e certas psicoses, tais como a esquizofrenia, a maníaco- depressiva, serão controladas e, muitas serão banidas. O busca do alívio do sufrágio transformante ocasionado pelo câncer, une o mundo, além de religião, cor, raça; unidos pela ciência. As idéias nascem sobre críticas dos que dormem dizendo que o ideal é impossível e inexequível. E tornam-se hediondos nos olhos dos que acordam com o barulho das marteladas do objeto idealizado e até então impossível. A ciência move-se à fundamentação, junto às condições genéticas de

cada indivíduo... Restarão do passado, as lembranças dos desenganos; no futuro jazem as sementes de muitas esperanças!

Mas, ia-me esquecer, vivo hoje em traje de luta despido de armas, munido de resultados que ainda cegarão os que não querem ver. Penados são eles, pois ferem outrem, sem saber a quem estão atirando. O mundo os esconde a beleza das cores.

Feliz estou e disso só posso ser grato; da sarça da alegria. Fiz a lição de casa, já posso enfrentar o mundo! Do passado lembra-me a beleza da pena do vate que me segredava aos tímpanos ainda jovens: Se deixo de ouvir a voz poderosa de Ernesto Pereira Lopes, vejo que sua eloquência não caberia mais neste mundo. Era muito maior e homens já não se fazem iguais. Mas suas palavras vestiram suas idéias, e persistem no arado dos dias, educando e formando outros homens, que hão de plantar outros gritos, em benefício de outrem.

“Quando partimos, no verdor dos anos, Da Vida pela estiada fluorescente... As esperanças vão conosco a frente, Vão ficando atrás os desenganos! Mais eis que a velhice chega lentamente, E vemos como a vida é rápida e falaz! E como sucede exatamente. Ao contrário do tempo de rapaz! Os desenganos vão conosco à frente.” As esperanças vão ficando atrás...”

Mais eis o milagre da generosidade, dos amigos que brotaram junto a mim! Que nestas palavras, do homem sábio que me fez médico, meu tio e avô, Professor Doutor Fioravante Alonso Di Piero, Presidente da Academia Brasileira de Medicina, venho fazer imortal em suas palavras a minha gratidão e acolhida; com a felicidade de desfrutar desta convivência longa; ou curta, intensa e certa, com o privilégio de amalgamar lembranças felizes e esperanças fugidias. Com efeito, se a esperança pressupõe as disposições alheias, percebo que encerro minha vida de estudante, sem nada me queixar.

Meus, familiares, colegas e amigos, sua bondade no curso destes anos, para mim do crescimento vivencial, é de tal grau, que para escrever tais palavras, mergulhei no eco de uma busca de nomes e lembranças, são tantos, que por medo da lacuna temporária na memória, quase me fez calar. Incluo todos, os anônimos, que passaram por esta minha vida. Brindo então, a voz do poeta do passado; vindo dos frutos da árvore por ele plantada, e o alento de tanta dedicação e amizade faz soprar a chama da minha dúvida, refazer a alegria desta alma, o zéfiro que realça a chama da felicidade, por tê-los comigo! Colherei as frutas, por ti plantadas, velho, sábio, homem e pescador, Avô Ernesto! E me aventuro dizer: E percebe que agora, chegado à defesa de da minha tese, quando o calor da amizade destes crédulos amigos, resulta: A paz! Aquece-me a chama desta Casa de Ensino, e solidário, (ousa a dizer): Renasço! E os desenganos? Fiquem eles, todos, para trás! Dominus amico vobiscum .

O meu muito e verdadeiro obrigado!

Agradecimentos

As instituições que me acolheram durante os ensaios mostrados nesta Tese: FCF-USP, o IQ-USP e a UNIFESP (INFAR e CINTERGEN)

Agnieszka Joanna Pawlicka Maule, se esta deferência for feita a todos os alunos, em nome dos mesmos, muito obrigado.

Ana Mara e Victor, na gênese dos encontros, nada é por acaso. Nasceu uma amizade duradoura e para ficar!

Ana Maria Plepis, Anselmo Gomes de Oliveira, Ruth Gouveia Duarte,

Aos amigos, que souberam ser presentes, atravessando os momentos em que a vida não trouxe apenas flores, confiando nas certezas que só os amigos verdadeiros são capazes de fazer valer: tia Mariza, tia Oayba, Carla, e tantos outros.

Aos meus padrinhos Gisele e Lalo, o meu amor por vocês não cabe em nanotecnologia.

Ao grupo de Toxicologia de FCF – USP – São Paulo, por possibilitarem os ensaios de CG-MS.

Ao meu Tio Luis e Carlos Pereira Lopes, pela sua grandiosidade frente à vida, sempre!

Aos amigos de todas as horas Kadú Niemeyer, Oscar e Antonio Lino, Cleber e Luciene Camargo, Glauco, Cau, Nelson, Túlio Regis

Aos companheiros da Fazenda, meus amigos de tantos anos, que sempre permaneceram comigo, como uma grande Família. Principalmente, Maria do Carmo, minha escudeira infinita.

Tia Ely por inspirar minha vida, com as minhas melhores histórias e por compartilhar comigo seu Pai, o mentor de todos os maiores médicos do País

Carol Costa – Manaus – AM – Mostrou-me muito, o universo que existe em uma membrana corioalantóica

Dr. Daniel Canedo, dizer não foi sua lição! Mas ter você como amigo é um enorme e irrestrito privilégio.

Dr. Eduardo Di Pieiro, por trazer parte do meu Tio, junto de mim.

Dr. Francisco Carlos de Campos Pereira Lopes, foi por você que conheci a medicina!

Dr. Ismael Ribeiro, sua amizade valeu-me de grandes momentos!

Dr. José Maria Modesto e Ivânia, vocês alegram meus momentos, com pitadas de verdadeira amizade!

Dr. Julio Raposo, amigo de todas as horas, mesmo quando estas se fazem de difícil!

Dr. Rogério Tiveron, pela ética e profissionalismo!

Dra. Cynthia de Campos Pereira Lopes, conversamos pelos olhos!

Dra. Ruth Faria, quem disse que competência não se mistura com tamanha beleza?

Drs. Alexandre e Ricardo Brandão, por terem feito o Amaral Carvalho o braço e esteio de milhares de pessoas.

Fernando, Vera, meus amigos Ituanos, cujas palavras e amizade sempre estiveram comigo! O desconhecido e o inexperado nos uniram! Feliz sou por isto!

Graci, Dani por fazerem Brotas tão especial!

Isis, minha prima querida, pelo amor incondicional.

Ivone e Sergio Mascarenhas, por contarem e fazerem parte dos grandes homens, no texto supra citado.

João Paulo Bonani pelas fotos preciosas e por manter meus pacientes curados durante minha ausência.

Luciana, minha Irmã e Renaldo Massini Junior. – DMC.

Luiz Paulo de Campos Bechelli, Obrigado por crer na verdade. O mato danoso não encobre a verdade, frágil, mas continuamente renacedoura. Aflora!

Luiz Carlos Donizetti Gonçalves, o Físico, por me lembrar que a vida vale a pena.

Lucas Vicente da Silva, por ter realizado todas as análises de imagem.

Maria Cristina, Neuza, (Biblioteca – IFSC)

Meu aluno Will, muito obrigado pela presença constante e impar.

Miguel Reale Junior-Luiz Guilherme Moreira Porto - Osvaldo Gianotti

Nilde Gameiro e Paulo Ranieri, por cederem sua família em tantos momentos, a favor deste trabalho.

O Staff da Manesco - Bruno Moreira – Paula – Marina.

Serviço de Pós Graduação da USP – São Carlos, Silvio Athayde, Victor, Cristiane, este fragmento e exatidão do tempo desta defesa, com certeza ficarão marcados. Das tempestades, que sejam elas, alimentadoras do copos vazios, saciando a todos os alunos que sentem sede para suas conquistas.

Silvia Mendonça, Rogério Olivatto, André Luiz,

Tia Zuleika – Uberaba. Uma vida doada aos irmãos! Luz do Céu!

Turma do Laboratório, em São Paulo: Carol Stella – minha fada sininho que diverte ainda, da terra do nunca, todo sonho infantil - , Elaine, Elisangela, Fernanda, Alberto, Julio, foram sem dúvida, o abraço mais apertado e a saudade que eu gosto de ter.

Wladerez e Cristiane – USP- São Carlos. Fizeram o que amigos fazem.

Vera Maria de Assis Moura Magalhães dos Santos, você é o fôlego que tira o soluço do choro. Talvez você nem saiba como você me faz bem!

Wilson Rodrigues – Alaíde, em nome dos pacientes obrigado!

A todos os que de alguma forma contribuíram para este trabalho, sem que seus nomes tenham sido escritos nesta lista finita e certamente incompleta, agradeço duas vezes.

Reza a Lenda, que uma árvore frutífera que nunca produziu frutos e plantas que nunca produziram flores, devem apanhar com chicote a ponto de terem seus caules feridos. Seria esta ação, um castigo por nunca terem produzidos. Após a surra, a planta castigada acordaria e começaria a produzir como nunca, muito mais que outra da mesma espécie, a qual não fora punida, faria normalmente. Ou seria que, frente a possibilidade da morte, devido aos retalhos feitos pela força bruta, a espécie produziria frutos e flores para perpetuar, assim, a sua espécie?

Resumo

Moléculas de origem vegetal foram há muito testadas como fonte de drogas antineoplásicas com sucesso promissor. Este trabalho trata dos efeitos antiangiogênicos do Metil Jasmonato. Este derivado hidrofóbico do ácido jasmônico foi demonstrado anteriormente como um agente de dano seletivo para a mitocôndria de células neoplásicas. *In vitro*, o Metil Jasmonato 1-10 mM promoveu a morte celular de células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC) e de melanoma murino (B16 -F10), enquanto concentrações micromolares foram inócuas. A inclusão do Metil Jasmonato em lipossomos de fosfatidilcolina e em um nanocarreador hidrofílico baseado em açúcar mostrou efeitos diferenciais sobre a citotoxicidade. A interrupção do ciclo celular foi observada em concentrações citotóxicas, enquanto a diminuição na produção de VEGF e algum grau de autofagia foram sugeridos em concentrações micromolares. *In vivo*, Metil Jasmonato 1-10mM foi francamente tóxico, e reduziu a densidade de vasos em membranas corioalantóicas de embrião de galinha (CAM). Entretanto, concentrações entre 1-10 μ M produziram um efeito complexo. Ocorreu aumento no brotamento capilar, mas os novos vasos apresentaram-se frágeis e menos organizados que os controles correspondentes. Sugere-se que, além da toxicidade direta, a ação do Metil Jasmonato sobre a angiogênese seja relevante para seu efeito antineoplásico.

Palavras-Chave: Metil Jasmonato, anti-angiogênese, modelo da CAM , cultura de células endoteliais, HUVEC

Abstract

Molecular plant components have long been tested as sources for antineoplastic drugs with promising success. The present work deals with the anti-angiogenic effects of Methyl Jasmonate. This hydrophobic Jasmonate derivative was previously demonstrated to selectively damage the mitochondria of cancer cells. *In vitro*, 1-10 mM Methyl Jasmonate induced the cell death of the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the Murine melanoma cells (B16-F10), while micromolar concentrations were ineffective. Methyl Jasmonate inclusion in phosphatidylcholine liposomes and in an hydrophilic sugar based nanocarrier presented differential effects upon cytotoxicity. Cell cycle arrest was observed in cytotoxic concentrations, while VEGF withdrawn and some autophagy was suggested in the micromolar range. *In vivo*, 1-10mM concentrations were explicitly toxic and reduced the vessel density of the Chorioallantoic Membrane of the Chicken Embryo (CAM). However, 1-10 μ M concentrations produced a complex effect. There was increased capillary budding, but the new vessels were leakier and less organized than corresponding controls. It is suggested that not only direct toxicity, but also the drug effects upon angiogenesis are relevant to the antineoplastic effects of Methyl Jasmonate.

Keywords: Methyl Jasmonate, antiangiogenesis, CAM model, endothelial cell culture, HUVEC

Lista de Abreviaturas

A-14 = Nanopartícula formada por carboidratos conjugados em ligações do tipo Alfa

1.4, rígida, patenteada, conjugada com Metil Jasmonato.

ACT-2U = Nikon ACT-2U Imaging Software from Excel Technologies, Inc.

Ang -1, 2 e 4 = Angiopoetinas 1, 2 e 1.

B16 –F10 = Linhagem celular de melanoma murino imortalizada.

bFGF = Basic fibroblast growth factor, em português: Fator de Crescimento de Fibroblastos, básico.

Bit = "Binary Digit", em português: "dígito binário").

CAM = Membrana Corioalantóica de Embrião de Galinha.

CG-MS = Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa.

CINTERGEN = Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica

CO₂ = Dióxido de carbono.

COX, COX-1, COX-2 = Cicloxigenase, isoformas 1 e 2 da Cicloxigenase.

DMSO = Dimetilsulfóxido

ELISA = "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay", em português: Ensaio Imunoenzimático em placas, revelação enzimática.

FACS = "Fluorescence Activated Cell Sorter", Citômetro de fluxo, instrumento para seleção e análise da composição de populações celulares por fluorescência.

FDA = "Food and Drug Administration", Agência regulatória americana.

FGF = Fibroblast Growth Factor, em português: Fator de crescimento de Fibroblastos.

HIF = Fator induzido por hipóxia.

HUVEC = Human Umbilical Vein Endothelial Cells, em português: células endoteliais de cordão umbilical humano

IL-8 = Interleucina - 8

LOX = Lipoxigenase.

MeJa= Metil Jasmonato.

MTT = [1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide]

MyoD = Fator regulatório importante na determinação e diferenciação de músculo.

NF κ B = Fator de transcrição nuclear Kappa B.

OPS = Orthogonal Polarization Spectra, em português sistema de espectro de polarização ortogonal, usado para análise de fluxo dinâmico.

PBS = “Phosphate buffered saline”, em português: Solução salina tamponada com fosfato

PDGF = Platelet-derived growth factor, em português: Fator de crescimento derivado de plaquetas.

PET SCAN = Positron Emission Tomography ou, em português, Tomografia por Emissão de Pósitrons.

PG, PGs = Prostaglandina, prostaglandinas.

PGE₂, G₂, H₂ = Prostaglandina E₂, G₂, H₂

PGF = “Placenta Grow Factor”, em português: Fator de Crescimento Placentário.

PIIF= “Proteinase Inhibitor Inducing Factor”, em português: fator indutor de inibidor de proteinase.

PPAR γ = Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama

PTPC = “**P**ermeability **T**ransport **P**ore **C**omplex”, em português: Complexo do poro de transporte de permeabilidade mitocondrial

RGB = Abreviatura do **sistema** de **cores** aditivas formado por Vermelho (Red), Verde (Green) e Azul (Blue).

RNase = Ribonuclease

RPM = Rotações por minuto.

RPMI = Meio de cultura celular desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial (RPMI).

SDF = “Side-stream Dark Field”, em português: sistema de campo-escuro por feixe lateral, usado para análise de fluxo dinâmico

TAP = Fator de Angiogênese Tumoral.

Tie-2 = Receptor tirosina-quinase expresso em tecido endotelial.

TIFF = Acrônimo para “Tagged Image File Format”, formato de arquivo de imagem

TNF α = “Tumor necrosis factor alpha” em português, Fator de Crescimento Tumoral Alfa.

UNIFESP = Universidade Federal de São Paulo.

v/v = razão de proporcionalidade volume por volume.

VEGF, VEGF- A = Vascular Endothelial Grow Factor, em português: Fator de crescimento vascular endotelial.

VEGF- B, -C, -D, -E = Fator de crescimento vascular endotelial –B, -C, -D, -E.

VEGFR2 = Receptor do VEGF, mais específico para a interação do VEGF-A.

VEGFRS = Receptores dos VEGFs. (todos os membros da família VEGF)

Lista de Figuras

Figura – 1	Salgueiro Branco. Foto tirada no Jardim de Monet. (Monet's Garden em Giverny, na Normandia). Fonte: CJ Walsh. 2004. Página.....	4
Figura - 2	Microfotografia eletrônica dos Cristais da Aspirina. Fonte: www.wellcome.ac.uk/ Revisada em 23 de Março de 2009. Página.	6
Figura - 3	Felix Hoffman, o pesquisador da Bayer que introduziu a Aspirina ao Mundo. Fonte: www.aspirin-foundation.com . Página.....	8
Figura - 4	O primeiro anúncio e propaganda do analgésico, quando o mesmo foi levado aos Estados Unidos. Fonte: Kathy A. Miles and Charles F. Peters II. starryskies.com/articles/dln/1-01/asprin.html . Página.....:	8
Figura - 5	O trabalho de Hill e Edwards, configurando pela primeira vez, o Metil Jasmonato. Fonte: Referendada na figura postada. Página...	12
Figura - 6	Jasmim, também conhecida como Jasmim Sambac. Desta florada é que em estudos fitobioquímicos encontrou-se, inicialmente, o jasmonato. Fonte: Science Today Ag Research, revisada em dezembro de 2008. Página.....	13
Figura -7	Folha sobre possível ataque de fungo, promovendo a senescência e apoptose, como forma de barreira para que o patógeno não possa destruir ainda mais o remanescente tecido vegetal. Página.....	16
Figura- 8	Protótipo da rota de síntese dos Jasmonatos./ Fonte Emilio Fehr/ Projeto A-14. Página.....	21
Figura - 9	Tomografia por emissão feita em folha de tabaco, depois de a mesma ser atacada por herbívoro. A parte vermelha indica a presença do Metil Jasmonato depois de vinte minutos do ataque. Fonte Richi. F, 2007. Página.....	23

Figura - 10	O herbivorismo atacando a vegetação e consequentemente acionando o gatilho do mecanismo de defesa da planta. Fonte Gentilmente Cedida pela FUNAMA, 17 de Fevereiro de 2009. Página.....	24
Figura-11	O processo de indução por um agente patogênico ou herbívoro, acionando o gatilho da liberação de sistemina. Fonte Gentilmente Cedida pela FUNAMA, 17 de Fevereiro de 2009. Página.....	25
Figura– 12	O pesquisador Israelense, Eliezer Flescher, descobridor do efeito seletivo dos Jasmonatos nas mitocôndrias de células cancerígenas. Fonte Fotografia do arquivo pessoal do mesmo, enviada para esta tese. Página.....	29
Figura– 13	O fator de crescimento endotelial em sua representação gráfica em terceira dimensão. Fonte Protein Data Bank/http://www.rcsb.org/pdb/home/home. Página.....	34
Figura- 14	Esquema ilustrativo do VEGF-A encaixando-se ao seu receptor VEGFR-2, e dando início ao gatilho da angiogênese. Fonte modificada, www.researchvegf.com . Página.....	35
Figura 14-A	Rota da angiogênese. Página.....	39
Figura - 15	Brotamento capilar início do processo de angiogênese Página...	40
Figura - 16	Balança representando o duplo equilíbrio entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Fonte modificada para o português, www.researchvegf.com . Página.....	42
Figura - 17	Ilustração representada os fatores de crescimento endotelial entre outros, influenciando diretamente na angiogênese e subsequente crescimento tumoral. Página.....	44
Figura - 18	Esquema da formação das prostaglandinas e das Co-enzimas Cox-1 e Cox-2, a partir do ácido araquidônico. Página.....	47
Figura -19	Ilustração mostrando a evolução da massa tumoral quando a mesma atinge um diâmetro acima de dois milímetros. Emory – Cancerquest. Modificado em fotogramas de animação gráfica em terceira dimensão. The VEGF History. Página.....	51

Figura -20	Ilustração demonstrativa da evolução tumoral, quando o tumor passa a crescer acima de dois milímetros de diâmetro, ocorre a produção do fator de crescimento, VEGF, para a formação de novos vasos, a partir dos já existentes, cujas funções serão de aumentar a oferta de oxigênio e nutrientes, a fim de suprir a necessidade da massa crescente. Emory – Cancerquest. Modificado em fotogramas de animação gráfica em terceira dimensão. Página.....	51
Figura -21	Ilustração demonstrativa da evolução da formação de novos vasos, a partir dos já existentes, com a liberação de VEGF e do encaixe do mesmo, nos receptores, encontrado nas células endoteliais dos vasos, e após o devido acoplamento da proteína, as transformações iniciadas a nível estrutural dos vasos. Emory – Cancerquest. Modificado em fotogramas de animação gráfica em terceira dimensão. Página.....	52
Figura -22	Ilustração esquemática da estrutura do lipossomo, mostrando o compartimento aquoso interno e a bicamada hidrofóbica. Ilustração livre da localização provável do MeJa, associado às superfícies da bicamada, nos lipossomos preparados com fosfatidilcolina purificada de ovos. Página.....	55
Figura -23	Vasos frestados no ambiente tumoral, com a potenciabilidade de formação de processo metastático devido à facilidade de migração de células neoplásicas, disseminadas em torno dos vasos. Página.....	56
Figura-24	Massa tumoral em torno do grande vaso, com extravasamento de células e substâncias não meio extracelular. Página.....	57
Figura -25	Extrusão dos lipossomos, feitos a partir de fosfatilcolina retirada de ovos. Página.....	65
Figura - 26	Semeadura das HUVECs em placas de 96 poços durante a execução do ensaio do MTT para estudo da citotoxicidade do MeJa. Página.....	67

Figura - 27	Procedimento de exposição das HUVECs ao MeJa durante o ensaio do MTT, ao final da etapa de careciamento de soro. Página.....	68
Figura - 28	Observação da morfologia das células na cultura estoque, em garrafas, antes do preparo de alíquotas para observação da viabilidade e para a realização dos diversos ensaios. Aspecto da sala de cultura com o microscópio invertido e a bancada de trabalho. No contra-plano encontra-se o fluxo laminar e a estufa de CO ₂ que não são vistos na foto. Página.....	70
Figura-29	Chocadeira usada no experimento dos ovos. Página.....	75
Figura -30	Ilustração do embrião desenvolvendo-se na face voltada a fonte de calor. Página.....	76
Figura-31	Ovos de Gallus Domesticus, sendo incubados na Chocadeira Zagas, cedida por cortesia pela Zagas Chocadeira Ltda. – São Paulo – São Paulo. Página.....	78
Figura -32	Ovos de Gallus Domesticus, sendo limpos e colocados na câmara e fluxo laminar para que o procedimento protocolar experimental possa ser iniciado. Página.....	81
Figura-33	Os ovos sendo marcados na face superior, todos ficaram nesta mesma posição até o final dos ensaios. A face marcada recebe o calor e direciona a formação da CAM, facilitando a abertura do mesmo para a observação do desenvolvimento do embrião. Página.....	82
Figura-34	Material de microcirurgia para abertura de ovos. Página.....	84
Figura -35	Ovo sendo perfurado na posição acima de sua câmara de ar, com uma agulha e uma seringa de 5 ml estéreis. Página.....	85
Figura - 36	Remoção de 5 ml da albumina fina, por sucção cuidadosa. Ângulo aberto, mostrando as posições instrumentais devidamente preparadas para este procedimento. Página.....	86
Figura -37	Esquema do ovo tendo sua albumina retirada, para a diminuição do saco vitelino, possibilitando assim o corte da casca para a visualização da membrana corioalantóica em formação. Página..	87

Figura-38	Orifício feito pela agulha para a retirada da albumina sendo ocluído com a fita semitransparente e asséptica. Página.....	89
Figura-39	Recorte da casca do ovo com a tesoura cirúrgica para obtenção de uma janela para observação do desenvolvimento do embrião. Página.....	90
Figura-40	Recorte da casca do ovo com a tesoura cirúrgica para obtenção de uma janela para observação do desenvolvimento do embrião.	91
Figura-41	Ovo sendo inspecionado, para verificação da sua viabilidade. Página.....	92
Figura-42	O Ovo sendo fechado para retornar a incubadeira por uma fita transparente e asséptica. Página.....	93
Figura -43	Ovo dentro da incubadeira completando 7º dia do início da incubação. Página.....	94
Figura -44	Modelo padronizado por diversos autores, para testes de drogas e a avaliação de seus efeitos <i>in vivo</i> , com a colocação de papel filtro sobre a CAM. Página.....	95
Figura -45	Aspecto da CAM no ovo e após a coleta. Um processo de irritação secundária pode ocorrer devido ao uso de papel filtro sobre a membrana corioalantóica do ovo de galinha em desenvolvimento. Página.....	96
Figura-46	Local onde foi escolhido para que o Metil Jasmonato fosse aplicado, sem que houvesse o processo inflamatório secundário. Página.....	98
Figura-47	Aberta uma janela de observação em sua face lateral superior, a mesma a qual recebeu o calor da chocadeira, posteriormente, observando a viabilidade do embrião, o mesmo ovo é fechado com uma fita transparente, estéril. Página.....	99
Figura– 49	CAM, em lâmina mantida entre lamínulas para não perder a umidade e uniformizar a espessura do material para coleta das imagens. Página.....	101
Figura-50	Lupa estereoscópica Nikon SMZ1800. Página.....	102
Figura-51	Ilustração da retirada da Albumina Fina, para ser utilizada nos estudos de viabilidade do embrião, frente a substancia. Página..	108

Figura-52	Tubos coniformes de polipropilenos – Falcons, com albuminas fina retirada dos ovos sob técnica estéril. Página.....	109
Figura-53	Esquema do ovo aberto, quando viabilidade do embrião encontra-se positiva, para ser semeado com as células do melanoma murino B16-F10. A redução do volume do ovo foi promovida também nos ovos destinados ao estudo de viabilidade e para que pudessem ser semeadas as células neoplásicas. Página.....	110
Figura-54	Amostra das albuminas reservadas para os ensaios de adição de Metil Jasmonato carregado pela clara fina. Página.....	111
Figura-55	Transluminescência dos ovos para a verificação de viabilidade embrionária. Fonte animalscience.ucdavis.edu. Página.....	112
Figura-56	Amostragem de ovos de diferentes cores, ilustrando fatores que dificultam a observação da viabilidade do embrião durante a ovoscopia. Fonte Fundação Nacional do Meio Ambiente “Dr Ernesto Pereira Lopes” – FUNAMA. Página.....	113
Figura-57	Morte embrionária no início do período de desenvolvimento do embrião. Página.....	115
Figura-58	O Metil Jasmonato sendo preparado adicionado nas albuminas para ser reintroduzido nos ovos. Página.....	117
Figura-59	Ilustração do ovo semeada com as células neoplásicas, no 4º dia de desenvolvimento embrionário, com janela e a reintrodução da albumina e sendo novamente ocluído e ficando incubado até o 17º dia de incubação. E o ovo, sem semeadura de células tumorais, recebendo a albumina pura. Página.....	118
Figura -60	Re-introdução de albumina nos ovos. Página.....	119
Figura- 61	Cromatograma do Metil Jasmonato. Injeção automática no modo splitless, temperatura de 250°C volume de 1 µL de uma solução de Metil Jasmonato em etanol, sob fluxo de Hélio de 0.6ml/min. Rampa cromatográfica início a 100°C por 1 min, inclinação de 10°C/minuto até 300°C, patamar de 300°C, mantido por 4 minutos, tempo total de 24,5min. Página.....	120

Figura- 62	Espectro de massa do pico principal do cromatograma do Metil Jasmonato em solução etanólica, como mostrado na figura 1 no tempo de retenção de 8 min e 15 s. Transferência do cromatógrafo para o detector a 250°C e detecção a 2 00°C, modo de varredura m/z 50-400. Página.....	121
Figura- 63	Fórmula estrutural plana do Metil Jasmonato, indicando os principais sítios de clivagem. Página.....	122
Figura- 64	Aspectos morfológicos dos efeitos tóxicos do Metil Jasmonato sobre as células endoteliais (HUVEC) e de melanoma murino (B16 -F10) em cultura de 60h. Página.....	131
Figura-65	Efeitos do Metil Jasmonato sobre o ciclo celular das células endoteliais (HUVEC) em cultura de 18h. Página.....	132
Figura - 66	Efeito de Metil Jasmonato sobre a angiogênese in vivo, comparação com os efeitos de PGE ₂ . As concentrações de cada composto, aplicadas sobre os discos de papel de filtro em um volume de 10µL, estão indicadas sobre as figuras. Microscopias de campo claro das membranas recortadas ao redor do papel e distendidas sobre lâminas de microscopia, sem coloração, aumentam de 2x. Página.....	136
Figura - 67	Imagem binária produzida a partir de amostras controle, como as mostradas na figura 66. Digitalização com o programa Image J. Página.....	136
Figura - 68	Ilustração do surgimento da CAM a partir das 48 horas, usando um filtro permitindo somente a impressão de cores âmbar, foto feito em Sony Cyber Shot 8 MP/ Transformada em Programa PHS. Página.....	137
Figura- 69	Embrião fotografado após 72 horas de incubação. Página.....	138

Figura - 70	Efeito de Metil Jasmonato sobre a angiogênese in vivo. A 10 mM; B 1mM; C 100 μ M; D 10 μ M; E 1 μ M; F 100nM; G e H controles. Microscopia de campo claro das membranas distendidas sobre lâminas de microscopia, sem coloração, aumenta de 2x. Página..	139
Figura- 71	Exemplo das imagens de brotamento capilar induzidas pelo Metil Jasmonato. Fotografias da membrana de um embrião tratado com 7,5 μ M de Metil Jasmonato, preparada sobre lâminas de microscopia, fotografada em campo claro num microscópio Jenamed em 250x por uma câmera Canon Powershot 640. Página.....	140
Figura - 72	Exemplo de imagens da CAM em que o contraste não permitiu o estudo quantitativo do crescimento de vasos nas membranas corioalantoicas de embrião de galinha. Fotografias da membrana de um embrião não tratado, preparada sobre lâminas de microscopia e digitalizadas em campo claro (A e D) e em campo escuro (B e E), aumentos de 2x (A e B) e 7x (D e E). E e F Imagens calculadas a partir da divisão das imagens de campo claro pelas de campo escuro, subtração da média da intensidades obtidas das componentes verde e azul da componente vermelha da imagem RGB e conversão em arquivos binários, mostrando efeitos de sombra e perda de sensibilidade para os vasos mais delicados. Página.....	141
Figura- 73	Efeito de Metil Jasmonato sobre o crescimento de vasos nas CAM. Área dos vasos, medidos a partir das imagens binárias dos vasos. Imagens binárias calculadas com o programa Image J a partir das fotos digitalizadas em campo claro após divisão pela imagem do fundo e subtração da média das componentes verde e azul da componente vermelha da imagem RGB. Página.....	143
Figura - 74	Massas tumorais de melanoma crescendo juntos aos vasos da CAM. Página.....	145

Figura - 75	Vasos descontinuados na presença de células de melanoma de murino. Página.....	146
Figura - 76	Formação desordenada de vasos associada à proliferação de células tumorais sobre a CAM. Página.....	147
Figura - 77	Aspecto do crescimento do tumor sobre a CAM após 10 dias de inoculação de $1,5 \times 10^4$ células de melanoma B16 -F10/ovo sem tratamento (A e B) ou após tratamento com Metil Jasmonato 100nM (C e D), 10 μ M (E e F) ou 1 mM (G e H). As membranas foram distendidas entre lâmina e lamínula e o mesmo campo foi fotografado com Lupa esteroescópica Nikon em campo claro (A, C, E e G) e campo escuro (B, D, F e H), aumento 7x. Página.....	149

Lista de Gráficos

Gráfico- 1	Efeito do Metil Jasmonato sobre o crescimento das células endoteliais (HUVEC, 2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços, na presença de diluições seriadas de Metil Jasmonato. Eixo principal, símbolos vazados citotoxicidade medida pela redução do MTT. Cada ponto corresponde à média de quatro leituras efetuadas em duplicatas independentes, exceto para o controle, medido em quadruplicata. O valor medido para os controles não expostos está mostrado pela barra de erro correspondente, sobre o gráfico. Eixo secundário, símbolos cheios tempo de dobramento calculado a partir das culturas celulares. Cada ponto corresponde à média de três ensaios independentes. Página.....	124
Gráfico- 2	Efeito do Metil Jasmonato sobre o crescimento das células de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços, na presença de diluições seriadas de Metil Jasmonato. Eixo principal, símbolos vazados citotoxicidade medida pela redução do MTT. Cada ponto corresponde à média de quatro leituras efetuadas em duplicatas independentes, exceto para o controle, medido em quadruplicata. O valor medido para os controles não expostos está mostrado pela barra de erro correspondente, sobre o gráfico. Eixo secundário, símbolos cheios tempo de dobramento calculado a partir das culturas celulares. Cada ponto corresponde à média de três ensaios independentes. Página.....	125

Gráfico- 3	Efeito do Metil Jasmonato sobre a viabilidade em 24h das células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço), medida pelo ensaio de redução do MTT em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de oito leituras efetuadas em quatro ensaios independentes, a linha contínua representa a medida dos controles não expostos, para comparação. Página.....	126
Gráfico- 4,5	Comparação entre o efeito do Metil Jasmonato puro ou carregado em lipossomos de fosfatidilcolina de ovo sobre o crescimento de células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço), ou de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço) em cultura em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de três leituras efetuadas em duplicatas independentes. Página.....	127
Gráfico- 6,7,8,9	Comparação entre o efeito do Metil Jasmonato puro ou carregado no nano carreador polimérico A14 sobre o crescimento de células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço), ou de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço) em cultura em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de três leituras efetuadas em duplicatas independentes. Página.....	128
Gráfico- 10,11,12,13	Toxicidade do Metil Jasmonato in vivo, estudo de sobrevivência. Os ovos embrionados foram expostos ao Metil Jasmonato nas doses de 100, 50, 10 e 5 μ l por ovo ($n=5$), em um volume de 5mL de albumina retirada do próprio ovo. Os controles foram expostos ao veículo, sem o MeJa. As concentrações indicadas na legenda foram calculadas assumindo-se o volume de 60 mL/ovo. Página.....	130

Gráfico-14	Toxicidade do Metil Jasmonato in vivo, estudo de sobrevivência. Os ovos embrionados foram expostos ao Metil Jasmonato nas doses de 100, 50, 10 e 5 µl por ovo (n=5), em um volume de 5mL de albumina retirada do próprio ovo. Os controles foram expostos ao veículo, sem o MeJa. As concentrações indicadas na legenda foram calculadas assumindo-se o volume de 60 mL/ovo. Página.....	134
Gráfico-15	Toxicidade do Metil Jasmonato in vivo, estudo de sobrevivência. Os ovos embrionados, cultivados com células tumorais, B16-F10, foram expostos ao Metil Jasmonato nas doses de 100, 50, 10 e 5 µl por ovo (n=5), em um volume de 5mL de albumina retirada do próprio ovo. Os controles foram expostos ao veículo, sem o MeJa. As concentrações indicadas na legenda foram calculadas assumindo-se o volume de 60 mL/ovo. Página.....	134
Gráfico-16	Efeito de Metil Jasmonato carregado em água (A, C, E e G) ou em lipossomos (B, D, F e H) sobre a angiogênese in vivo. A e B controles do veículo; C e D 30 µM ; E e F 15 µM; G e H 7,5 µM. Microscopia de campo claro aumento de 2x. Página.....	142

Lista de Quadros

Quadro -1	Cronologia dos descobrimentos em fitologia, até a compreensão dos elementos das famílias dos Jasmonatos. Página.....	19
Quadro -2	Similaridade entre as rotas dos Jasmonatos e das Prostaglandinas. Página.....	27
Quadro -3	Esquema ilustrativo do envolvimento das prostaglandinas e das co-enzimas Cox -1 e Cox-2, no processo carcinogênico. Página.....	47

Lista de Tabelas

Tabela -1	Fragmentos observados durante a análise do Metil Jasmonato em solução etanólica. Página.....	122
Tabela -2	Efeitos do Metil Jasmonato sobre o Ciclo celular e a produção de VEGF em HUVECs. Página.....	133

Sumário

1	INTRODUÇÃO. Página:	01
	História do sistema de defesa dos vegetais e de seu uso medicinal.	
1.1	Página:	01
	Desenvolvimento das aplicações industriais das substâncias	
1.2	componentes do sistema de defesa dos vegetais. Página:	10
	A proposição do Metil Jasmonato como um agente antineoplásico.	
1.3	Página:	20
1.4	O Metil Jasmonato em nanopartículas. Página:	30
1.5	A importância da angiogênese no contexto das neoplasias: Pagina:	31
1.6	Alvos moleculares da terapia antiangiogênica. Pagina:	49
1.7	Nanotecnologia, angiogênese e câncer. Página:.....	52
	A Nanotecnologia e as Ciências dos materiais aplicadas ao	
1.8	desenvolvimento de medicamentos. Página:.....	58
2	OBJETIVOS. Página:	61
2.1	Objetivos específicos. Página:	61
3	ESTRATÉGIA. Página:	62
4	MATERIAIS E MÉTODOS. Página:	63
4.1	Análise de Metil Jasmonato. Página:	63
4.2	Preparo de lipossomos de fosfatidilcolina de ovo. Página:	64
4.3	Incorporação de Metil Jasmonato aos lipossomos. Página:.....	65
	Estudo da citotoxicidade do Metil Jasmonato em cultura de células	
	endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) e de	
4.4	melanoma murino (B14 -F10). Página:	66
	Estudos do mecanismo de ação do Metil Jasmonato sobre as células	
4.5	endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC). Página:	67
	Estudo de angiogênese in vivo, no modelo da membrana corioalantóica	
4.6	de embrião de galinha. Página.	74

	Preparo dos ovos para os ensaios protocolares com Metil Jasmonato nas membranas corioalantóicas dos embriões de galinha (CAM).	
4.7	Página:	83
	Modelos de angiogênese modificado, em membrana corioalantóica de	
4.8:	embrião de galinha, observando o efeito do Metil Jasmonato, em água e nanocarreadores	
	Página:.....	97
	Adaptação do modelo de angiogênese modificado, em membrana corioalantóica de embrião de galinha, para estudo do efeito do Metil	
4.9	Jasmonato na presença de tumores. Página:	104
	Estudos de sobrevivência utilizando a albumina do ovo como veículo para o	
4.10	Metil Jasmonato. Página:	107
5	Resultados Página:	120
5.1	Efeitos do Metil Jasmonato in vitro sobre o crescimento celular: Página:..	123
5.2	Efeitos do Metil Jasmonato no modelo de angiogênese in vivo. Página: .	133
5.3	Efeitos do Metil Jasmonato sobre a angiogênese. Página:.....	135
5.4	O Cultivo de Melanoma de Murino em CAM. Página:	144
6 -	DISCUSSÃO. Página:	150
7-	CONCLUSÕES. Página:.....	173
	REFERÊNCIAS. Página:	175
	Aprovação da Comissão de Ética: Página:.....	199
	ANEXO A. Página:	200
	ANEXO B. Página:	221
	ANEXO C Página:	225

1 Introdução

1.1 História do sistema de defesa dos vegetais e de seu uso medicinal

O sistema de defesa das plantas há muito tempo é alvo da curiosidade científica. Muitos relatos permaneceram inconclusos pelas diferentes vertentes da pesquisa em todo mundo. Contudo, haviam postulados em comum às diversas teorias propostas sobre o assunto. Uma das hipóteses, confirmadas a partir de postulados iniciais, propunha que as plantas possuíam um complexo imunitário, análogo ao sistema imune inato dos animais. Da mesma maneira que nos animais, o estresse oxidativo em vegetais estimula a biossíntese de componentes antioxidantes e induz ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes. No entanto, no início do estresse sofrido pelo vegetal, seja ele ocasionado por predadores, mudanças de temperatura, sobrecarga eletromagnética ou mesmo pela escassez de água, pode ocorrer uma diminuição na síntese protéica e a conseqüente redução de atividades antioxidantes. Este fato contribui para um aumento na produção de substâncias reativas de oxigênio. A planta inicia, a partir da sinalização bioquímica resultante, a produção de enzimas e de outras substâncias não enzimáticas que protegem as células vegetais dos efeitos nocivos de moléculas oxidantes (FARMER; RYAN 2000).

Este mesmo mecanismo é essencial a processos fisiológicos diversos, participa desde a proteção ao dano tecidual localizado, até a sinalização celular à distância entre indivíduos da mesma espécie.

Os primeiros estudos científicos ocorreram na Grã Britânica, no final do século 19. O pesquisador Harry Marshall Wards, publicou um livro, onde propunha a necessidade de se tratar todo o cultivo de batatas, quando nele se encontrassem elementos doentes (MARSHALL, 1898).

Na mesma época, o mundo havia sido surpreendido com a descoberta de uma potente droga contra dores e inflamações, oriunda do reino vegetal; a Aspirina. Desde então, as plantas passaram a ser vistas como um laboratório que poderia propiciar inúmeros medicamentos, a serem descobertos e explorados pelo homem. Em especial, os Salgueiros tornaram-se o foco dos primeiros estudos científicos, sobre derivados de plantas e seus possíveis efeitos curativos. Evidências consagradas pelo uso ancestral e popular dos vegetais forneceram os primeiros elementos sobre os quais se basearam as investigações científicas.

Reza a lenda, que quando os carroceiros desarreavam as mulas e cavalos, os animais que estavam machucados, enquanto livres, caminhavam até um salgueiro na beirada do Rio Tamisa, entre tantos, e se coçavam e friccionavam suas chagas na casca do mesmo. Este ritual, aparentemente cíclico e constante, fazia com que a estrutura daquele salgueiro fosse destruída aos poucos. Os muares e eqüinos pareciam selecionar somente as árvores assim mutiladas, para poder sanar a dor ou o prurido de suas chagas. A história da aspirina vem, além dos escritos épicos, da Assíria e do Egito. Contudo há relatos que os índios da America do Norte usavam folhas que continham o mesmo principio para curar a dor nas costas (LÉVESQUE ; LAFONT, 2000).

Os estudos do salgueiro foram, entretanto, aprofundados na Inglaterra. Entre os anos de 1757 e 1763, o reverendo Edward Stone documentou aquele inexplicável ritual e realizou os primeiros estudos acadêmicos naquela planta, que futuramente se saberia ser uma fonte natural de salicilatos. Após tomar conhecimento da história de um Bispo, morador de Nápoles na Itália, que era conhecido por ser milagreiro e por possuir o poder de cura em suas mãos, dominar a magia de retirar a dor das pessoas, com a ajuda de partes maceradas de uma planta, Edward Stone ficou obstinado para estudar a planta. Culto, ele rapidamente associou o conhecimento do conteúdo bíblico, em Levítico, que menciona o poder medicinal das folhas e galhos do salgueiro que nasciam nos riachos. A história da medicina também contribuiu para promover o interesse por essa árvore, em especial. Relatos médicos mostravam que, há 2400 anos, Hipócrates recomendava mastigar as folhas de salgueiro para o tratamento de doenças e em trabalhos de parto. Galeno acreditava nos efeitos terapêuticos dos extratos da casca e das folhas do salgueiro e também indicava aos doentes o seu uso, para aliviar as dores, a febre e as inflamações decorrentes de inúmeros males. Referências ao uso de substratos dos salgueiros, citados como dádiva da natureza, podem ser encontradas em textos da idade média e do renascimento. As citações mais remotas sobre o uso de produtos medicinais fitoterápicos alcançam até a pré-história (LAFONT , 2007).

Figura - 1: Salgueiro Branco. Foto tirada no Jardim de Monet. (Monet's Garden em Giverny, na Normandia). Fonte: CJ Walsh. 2004

Naquela época, a malária era endêmica, na Inglaterra, e a única fonte de cura era o quinino, extraído da casca da cinchona. Entretanto, a casca da cinchona era importada da América do Sul e possuía um alto custo, para o tratamento abrangente de todos os doentes. Stone percebeu que a casca do salgueiro, conhecido na Europa como sendo o Salgueiro Branco da Inglaterra (figura 1), tinha um gosto parecido com o da cinchona. Ele também observou que o salgueiro crescia em locais onde a malária era comum. Daí a sugerir que o salgueiro continha a cura para a maleita foi mais um passo, e sua "intuição" foi testada com êxito em 50 pacientes, sendo seus resultados apresentados à Sociedade Real Londrina, despertando a partir deste feito, a curiosidade dos cientistas.

Houve uma comoção em torno deste achado, contudo a ciência, nos seus primeiros passos, não sabia como é que a planta atuava e o seu princípio ativo era um mistério. Como consequência, o salgueiro começou a ser estudado com profundidade, pelas técnicas consideradas modernas para a época. Porém esta busca durou mais de 60 anos. Somente depois, de uma intensa jornada de estudos e formulações, hipoteticamente discordantes, entre os cientistas que compunham e egrégia e respeitada comunidade científica européia, inclusa na Sociedade Real Londrina, foi apresentada uma substância retirada da planta. Durante décadas, pesquisadores italianos, orientados por Bartolomeo Rigatelli estudaram formulações feitas com extratos de salgueiros, e em 1824 apresentaram um medicamento denominado: “salino amarissimo antifebbre”, sal amarguíssimo antifebril. Neste mesmo ano, Fontana e Brugnatelli denominaram este agente ativo a salicina, brindando o mundo com o que talvez fosse o princípio ativo que cercava o mistério da árvore da cura, depois de mais de meio século de pesquisas e especulações (MARSON ; PASERO , 2006).

Figura - 2: Microfotografia eletrônica dos Cristais da Aspirina. Fonte: www.wellcome.ac.uk/Revisada em 23 de Março de 2009.

Este glicosídeo foi convertido no ácido salicílico por Píria em 1839. O ácido é sintetizado hoje por um processo desenvolvido por Kolbe e Lautemann em 1860 (usando hidróxido de sódio, fenol e CO_2). Porém a ciência começou a embasar a história do substrato vegetal, quando o francês Charles Gerhardt e o alemão Karl Kraut começaram a estudar melhor o princípio ativo da planta do Salgueiro, cujo nome científico é *Spiraea ulmaria*, marcando o início da história da aspirina (figura 2). Foi somente em 1897 que Felix Hoffman (figura 3), um jovem estudioso das ciências de formulações e medicamentos, da farmacêutica alemã Bayer, que procurava um jeito de ajudar o pai a combater o mal-estar crônico provocado pelo reumatismo, ajudado pelo professor Heinrich Dreser, sintetizou o ácido acetilsalicílico, escrevendo e apresentando a fórmula de uma droga capaz de aliviar as dores.

No momento histórico de sua descoberta, aparentemente, a formulação encontrada não possuía muitos efeitos colaterais.

Figura - 3: Felix Hoffman, o pesquisador da Bayer que introduziu a Aspirina ao Mundo. Fonte: www.aspirin-foundation.com

Nascia o nome Aspirina, dado a esta formulação. A gênese deste nome bifurca-se em duas vertentes. A ciência dá como etimologia desta nomenclatura, que ASPIRIN, vêm: “**A**” de Acetil, “**SPIR**” da planta *Spiraea ulmaria* (de onde era retirada a Salicin) e “**IN**” um sufixo comum para medicamentos. A lenda, diz que o nome vem para homenagear Santo Aspirinus, o Bispo italiano padroeiro das dores de cabeça que inspirou Stone em suas pesquisas. O produto foi apresentado oficialmente pela indústria alemã Bayer em 10 de outubro de 1897, como mostra o anúncio reproduzido na figura 4 (EXPECT WONDERS, 2009).

Figura - 4: O primeiro anúncio e propaganda do analgésico, quando o mesmo foi levado aos Estados Unidos. Fonte: Kathy A. Miles and Charles F. Peters II. starryskies.com/articles/dln/1-01/asprin.html

Em 1905, o cientista, Marshall Ward, já renomado botânico e também membro da prestigiada Sociedade de Botânica de Viena, novamente surpreendeu o mundo. Ward proferiu para a comunidade científica européia, sua teoria sobre a ocorrência, no reino vegetal, de "anticorpos" produzidos pelas plantas, para justificar o uso de determinados vegetais em pacientes, na época, importantes na contenção do processo infeccioso decorrente de algumas doenças. Segundo ele, estes compostos poderiam ter uma ação de caráter defensivo, ou seja, seriam pré-formados, de maneira a atuar de modo profilático.

Porém, em determinadas situações, as plantas poderiam induzir a produção de defesas para lutar com uma infecção já instalada. O princípio do antibiótico oriundo de plantas nascia destas hipóteses (MARSHALL, 1905).

Somente em 1941, algumas décadas depois da morte de Marshall, Muller, um de seus discípulos, nomeou os compostos teorizados pelo seu tutor como fitoalexinas. O termo desta nomenclatura referia-se de forma genérica aos componentes do sistema imunitário das plantas. Prevaleceu a percepção acadêmica de que estes compostos eram sintetizados pelo sistema de defesa vegetal após o ataque de um agente agressor (MULLER, 1947).

As previsões de Marshall, em seus primeiros estudos, foram confirmadas na segunda metade do século 20. Referendaram-se ainda os seus discursos do início do século, nos quais ele hipotetizava que a defesa das plantas não era somente composta por uma única substância, e sim por inúmeras outras. O primeiro composto identificado como uma fitoalexina foi isolado e caracterizado em 1960, por Cruickshank e Perrin. A molécula era uma pterocarpanoisoflavona, chamada de pisatina, isolada por processos químicos a partir de vagens de ervilha (*Pisum sativum*) (CRUICKSHANK; PERRIN, 1960).

Em adição ao achado científico inicial, dado pelo isolamento da pisatina, nova investigação acabou por revelar um conjunto composto por diferentes moléculas e também, uma grande diversidade de substâncias associadas à natureza química das fitoalexinas.

O estudo de Cruickshank e Perrin abrangia praticamente todo o espectro químico de produtos naturais encontrados principalmente nos legumes. A diversidade de moléculas citadas neste estudo evidenciou a necessidade de se aprofundarem as pesquisas sobre o assunto. Estas moléculas compunham um extenso repertório de metabólitos secundários, presentes em concentrações variadas em todos os tecidos vegetais adultos, cujas funções principais pareciam ser a defesa contra a invasão microbiana. A sua função principal, hipoteticamente, seria evitar a disseminação de bactérias ou fungos no interior dos tecidos vegetais, constituir uma barreira primária contra as infecções por microrganismos. Em contrapartida, estabelecia-se o conceito de que, no reino vegetal uma ação específica molecular e fisiológica associada a esta função específica implicava a consequência de exercer uma pressão seletiva sobre patógenos.

1.2 Desenvolvimento das aplicações industriais das substâncias componentes do sistema de defesa dos vegetais

O início das grandes monoculturas e a competitividade externa na venda de produtos agrícolas ampliou sobremaneira a necessidade do entendimento da biologia dos patógenos e do desenvolvimento de maneiras de fortalecer a agricultura através da destruição de pragas.

Foi, no entanto, somente após o ano de 1960, que o mundo acadêmico viu estabelecerem-se as teorias sobre as defesas naturais do reino vegetal. Porém nenhuma hipótese foi aceita de forma ampla entre os estudiosos da área, e a controvérsia resultou numa construção gradual e fragmentada do conhecimento sobre a ativação bioquímica das diversas vias relacionadas ao sistema defesa das plantas.

Em 1962 um grupo de três pesquisadores, Demole, Lederer e Mercier, descreveram uma molécula, originada a partir da resposta da defesa imunitária da vegetal, que tinha o odor similar ao jasmim. Isolaram-na e concluíram o seu achado, determinando a estrutura do jasmonato de etila. Todavia, embora a molécula tenha sido isolada, ainda o seu efeito não foi prontamente esclarecido. A substância sintetizada a partir da ativação do sistema de defesa vegetal propagava um intenso odor, levando a conclusão que o elemento molecular isolado, derivado da defesa imunitária da planta, poderia ser uma forma de defesa que também se exteriorizava, através e além das células vegetais. Surgiu daí a proposição de que o perfume advindo das floradas de jasmim poderia ser uma forma de defesa constituída pela planta, além do efeito único de atração de insetos para a polinização de suas flores. Os perfumes das floradas das plantas constituiriam um padrão de resposta do sistema imunitário, exalados como resposta exteriorizada pelo vegetal, durante o processo de agressão (DEMOLE; LEDERER; MERCIER, 1962).

Na seqüência deste trabalho, estudando diretamente o jasmim, o mesmo grupo de pesquisadores identificou uma série de outras estruturas relacionadas e derivadas do ácido jasmônico, uma variedade de moléculas que viriam a compor a família dos Jasmonatos (DEMOLE; WILLHALM; STOLL, 1964).

Em 1964, Aspinall, Paleg e Addicott, demonstraram que elementos da família dos Jasmonatos eram hormônios regulatórios, descortinando a intensa complexidade da resposta imunológica dos vegetais. Do trabalho deste grupo de cientistas originou-se a denominação “hormônio de estresse vegetal” (ASPINALL; PALEG; ADDICOTT, 1967).

Em 1965, Hill e Edwards identificaram a estrutura do Metil Jasmonato, a principal molécula reguladora pertencente à Família dos Jasmonatos e que também possui um forte e conhecido odor de jasmim (HILL; EDWARDS, 1965). O cabeçalho do trabalho inicial sobre o Metil Jasmonato, publicado por estes autores está mostrado na figura 5.

Figura - 5: O trabalho de Hill e Edwards, configurando pela primeira vez, o Metil Jasmonato. Fonte: Referendada na figura postada.

Em 1967, Crabalona L identificou a presença de Metil Jasmonato no óleo da planta do Alecrim da Túnisia, documentando, em sua publicação, a hipótese de que a mesma viesse a ser parte constitutiva de todos os vegetais, quando tivessem seus sistemas de defesas acionados. (CRABALONA, 1967).

Este fato relevante trouxe a notoriedade de que outros elementos da família dos Jasmonatos poderiam ter uma ocorrência natural mais ampla do que a sua presença nas floradas de Jasmim, cuja flor está mostrada na figura 6. E ações adicionais além da ação odorífica, que deveriam ser estudadas.

Figura - 6: Jasmim, também conhecida como Jasmim Sambac. Desta florada é que em estudos fitobioquímicos encontrou-se, inicialmente, o jasmonato. Fonte: Science Today Ag Research, revisada em dezembro de 2008.

Os Jasmonatos se compuseram rapidamente como uma extensa família de moléculas de ocorrência natural, fato este, que trouxe à luz da ciência a necessidade de entender o papel funcional ativo de cada uma destas estruturas. Ainda em 1967, Millborrow confirmou os achados de Crabalona e conseguiu determinar quantitativamente o Metil Jasmonato presente em amostras de tecidos vegetais, legitimando que esta molécula fazia parte do sistema de defesa vegetal. (MILBORROW, 1967).

No entanto, a função específica e os efeitos biológicos dos Jasmonatos permaneciam desconhecidos, um desafio inconcluso aos cientistas da época. Kotaka e Krueger, em 1969 publicaram um artigo essencial para esta compreensão, que viria somente 15 anos depois, descrevendo o fato de que a planta poderia mudar sua estrutura, de forma a se proteger de determinadas agressões. O termo sinalização genética estava começando a despontar na linguagem e percepção científica. (KOTAKA; KRUEGER, 1969).

Sibaoka e Thimann, em 1970, demonstraram o fato de que uma mesma substância poderia promover ações diversas em plantas, descortinando assim um processo fisiológico mais complexo (SIBAOKA; THIMANN, 1970). No mesmo ano, surgiram os primeiros relatos sobre os efeitos e a rota de produção dos Jasmonatos. (ROSS; WEBSTER, 1970). Estes estudos seguiram-se pela sistematização dos efeitos individuais dos ácidos envolvidos nas reações químicas da fisiologia vegetal (SONDHEIMER et al., 1971; ALDRIDGE et al., 1971; MILBORROW, 1970).

Os efeitos relatados sobre as mudanças das cores nas folhas, durante as mudanças climáticas, despertaram o interesse na análise bioquímica e morfológica das mesmas, o que culminou com a necessidade de entender os efeitos da síntese protéica ocorrida no processo de senescência, como ilustrado na figura 7. Surgiam

na literatura os relatos sobre a atividade das proteases relacionadas a este processo (MARTIN; THIMANN, 1972).

Nesta época, os diversos grupos botânicos espalhados pelo mundo voltaram seus estudos, de forma mais específica às necessidades das suas regiões, estudando as plantas que constituíam os diversos biossistemas do planeta.

Aos poucos, o mundo era decifrado frente ao conhecimento vegetal e suas possíveis aplicabilidades econômicas.

Este fenômeno viria a revolucionar o mercado agro produtivo mundial, uma vez que já era compreendido o efeito dos inibidores de protease, e as suas conseqüências benéficas no combate aos predadores naturais do plantio. As Academias de Botânica Internacionais estimulavam a perseverança entre seus diversos membros com o objetivo de melhor entender as patologias que se agravavam em inúmeras lavouras produtivas, decorrentes de ataques dos insetos herbívoros e fungos. Tornava-se cada vez mais relevante a busca de formas químicas que poderiam tornar os vegetais mais resistentes a tais pragas. A palavra Ecologia começava a ser ecoada em países industrializados. Muito embora ignorada ainda no meio maciço dos agricultores, havia já a tendência, entre os membros do mundo acadêmico, a pressionar o governo, no alerta para terem cuidado com o meio ambiente.

Foi em 1975, que pesquisadores começaram a publicar a congruência dos estudos da fisiologia vegetal em favor do melhor entendimento e de benefícios para a agricultura (TAKAGI et al., 1975).

Em todo o mundo, os cultivos deixavam de ser uma ação artesanal para se tornarem uma forma maciça de produção, voltada para o consumo interno ou para a exportação. As agriculturas de cunho familiar davam espaço para as monoculturas

regionais, em favor do mercado crescente. A primeira publicação a abordar os Jasmonato como pesticida natural versou sobre a sua aplicabilidade ao cultivo de folhas de tabaco (TAKEGAMI, 1975).

No início dos anos 80, o Metil Jasmonato foi identificado como o agente provocador da senescência (TAKAKI, 1977 apud UEDA; KATO, 1980), que recém havia sido compreendido como parte da fisiologia vegetal (THIMANN; SATLER, 1979).

Figura -7: Folha sobre possível ataque de fungo, promovendo a senescência e apoptose, como forma de barreira para que o patógeno não possa destruir ainda mais o remanescente tecido vegetal.

A associação entre o processo de senescência e a defesa vegetal evidenciou a relevância econômica dos efeitos dos derivados do ácido jasmônico para a agricultura.

A senescência foliar, cuja manifestação mais abundante é o amarelamento das folhas que não têm energia para realizar a fotossíntese, leva à queda da produção de biomassa da planta (frutos, sementes, fibras, etc.) e resulta em perdas na colheita e na produção, dentre outros prejuízos. Nos anos seguintes, a agricultura continuou impulsionando os cientistas na busca de meios seguros para aplicação de defensivos agrícolas naturais.

A partir dos anos 80, outra corrente de investigação passou a ser relevante no estudo dos derivados do ácido jasmônico. A indústria farmacêutica se posicionou no incentivo à prospecção de ingredientes ativos oriundos de vegetais que apresentassem atividade com potencial uso terapêutico. (LOUB; FARNSWORTH, 1983). Outro interesse farmacêutico precedeu a inclusão desses compostos entre as substâncias consideradas relevantes na busca de novos fármacos. Dada a importância financeira, os elementos da família dos Jasmonatos foram estudados de uma maneira abrangente pelas indústrias de perfumes e cosméticos, pela sua fragrância (HO, 1977).

É preciso considerar que o alto custo de todo o processo até a realização dos bioensaios foi, desde o início, um fator impeditivo ao desenvolvimento de um novo fármaco, desde a descoberta da atividade de um extrato vegetal. Entre os medicamentos oriundos de plantas, os alcalóides da vinca, sulfato de vincristina e o sulfato de vinblastina são drogas desenvolvidas nesta época e utilizadas até hoje, no tratamento do câncer. (FARNSWORTH, 1982).

Como estratégia para diminuir os gastos, ações secundárias dos agentes já conhecidos passaram a ser investigadas e ganhou notoriedade o desenvolvimento de novos medicamentos a partir do desenho e síntese química orientada pelo estudo das relações estrutura-atividade de séries de compostos. Mesmo assim, substâncias naturais, principalmente as derivadas do reino vegetal, perduraram como a principal fonte de substâncias ativas como medicamentos. Havia, todavia, uma preocupação entre os fármaco-químicos, de encontrarem a droga denominada “inteligente”. Ou seja, uma droga capaz de ser ativada somente no sítio de ação esperado, evitando-se assim os efeitos colaterais.

Passado mais de um século de existência, até a década de 1980, o ácido salicílico voltou a ser a droga antiinflamatória não esteróide mais pesquisada. Seus diversos usos e seus efeitos colaterais situavam-na dentre as mais controvertidas moléculas, discutidas e usadas em todo mundo. Até os dias de hoje, a aspirina é a única substância derivada do sistema de defesa dos vegetais que teve aplicação terapêutica expressiva. A cronologia descrita está resumida no quadro 1.

Quadro 1 - Cronologia dos descobrimentos em fitologia, até a compreensão dos elementos das famílias dos Jasmonatos.

Histórico da Busca de Medicamentos em Plantas

Edward Stone, observa e menciona oficialmente o Salgueiro como planta medicinal - 1757
Fontana e Brugnatelli, isolaram a Salicina, convertido em ácido salicílico – 1839.
Kolbe e Lautemann, sintetizaram o ácido salicílico – 1890.
Harry Marshall Wards, Menciona que as plantas possuíam mecanismo de defesa - 1895
Felix Hoffman e Heinrich Dreser, sintetizaram o ácido acetil salicílico – 1897.
Muller, discípulo de Marshall Wards, isola a primeira molécula referente a defesa vegetal - 1947
Cruickshank e Perrin, isola a primeira fitoalexina em legumes, vagem – 1960.
Demole, Lederer e Mercier, isolaram uma molécula referente a defesa vegetal no jasmim -1962.
Aspinall, Paleg e Addicott, descobrem a família dos Jasmonatos – 1964.
Hill e Edwards, desenham e definem a fórmula estrutural dos Jasmonatos – 1965.
Crabalona L, descobriu que existia elementos dos jasmonatos em outras plantas também – 1967.
Millborrow, metodizou uma maneira de medir a quantidade de Jasmonatos em plantas -1967.
Kotaka e Krueger, propunha o termo “ Sinalização Genética” na defesa vegetal - 1969
Sibaoka e Thimann, propõe que a defesa vegetal é feita com interação de várias moléculas-1970.
C. Ross Be e Gbr Webster, propuseram pela primeira vez, a rota e a ação dos Jasmonatos – 1970.
Sondheimer, Galson, Change e Walton, propuseram o estudo singular a cada molécula RDV -1971.
Martin C. e Kv Thimann, observaram o envolvimento de moléculas RDV na senescência - 1972.
Takagi M e Colegas, propuseram que moléculas RDV, poderiam ser usadas na agricultura – 1975.
Clarence Ryan, definiu a existência de uma fator móvel para indução RVD – 1977.
Thimann KV, So Adler, desvendaram a relação entre as moléculas RDV e a senescência - 1979.
Loub e Farnsworth, propõe o estudo em vegetais de princípios ativos desconhecidos – 1983.
Loub e Farnsworth, descobrem elementos ativos em vegetais usados contra o câncer – 1983.
B.A.Vick and D.C.Zimmerman, junto com outros autores, revisaram a rota do Jasmonato -1984/90.
Farmer, mostrou que a produção de Jasmonato estava ligada a fatores exógenos – 1990.
Pearce, G.; Strydom, D.; Johnson, S, descobriram a Sistemina, um agente poderoso, que seria a molécula inicial no complexo processo RDV – 1991.
T. K. Sarkar, B. K. Ghorai, mostraram que a produção de jasmonatos era intracelular – 1994.
Shewry, P.R e Lucas, definiram os elementos RDV, baseadas em características estruturais e químicas Os três elementos principais encontrados foram, em ordem cronológica mediante as pesquisas de elementos envolvidos na defesa vegetal: o etileno, e ácido salicílico, o éster metílico e por fim, o ácido jasmônico e seu éster metílico, o metil jasmonato - 1997

1.3 A proposição do Metil Jasmonato como um agente antineoplásico

No final do século 20, as academias avançaram em elucidar aspectos sobre a biologia vegetal dos Jasmonatos e sua síntese química (KATAKOA et al., 1987). Estes compostos foram relacionados a vias de sinalização celular dos vegetais a partir de áreas lesadas, para outros indivíduos da mesma espécie. O grupo liderado pelo pesquisador Dr. Clarence Ryan, pioneiro de tais investigações, propunha, há décadas, que um fator molecular móvel era responsável pela indução de respostas de proteção sinalizadas entre indivíduos, e o definiu como PIIF – “Proteinase Inhibitor Inducing Factor” (SIMMONS; RYAN, 1977). Quando a síntese dos Jasmonatos começou a ser demonstrada, como sendo uma ação intracelular das células vegetais, surgiram as primeiras evidências de que os elementos desta família talvez pudessem estar envolvidos na ação do PIIF. (SARKAR; MUKERJEE; GHOSH, 1998). Posteriormente, foi delineado todo um sistema de mensageiros intracelular e intercelulares incluindo o metabolismo lipídico das membranas da célula vegetal (SCHRODER; ANGEW, 1998).

A via de síntese dos Jasmonatos foi descrita, ainda incompleta, por Vick e Zimmerman, em uma publicação que gerou a discussão, na literatura, sobre a generalidade das reações bioquímicas descritas (VICK; ZIMMERMAN, 1984; POSNER; ASIRVATHAN, 1985). O protótipo da via está ilustrado na figura 8.

Figura-8: Protótipo da rota de síntese dos Jasmonatos./ Fonte Emilio Fehr/ Projeto A-14.

Posteriormente, este protótipo foi confirmado e ampliado, até que em 1990, Edward Ernest Farmer e Clarence Ryan estabeleceram definitivamente a seqüência linear de reações bioquímicas de síntese que resultava na formação de vários agentes, dentre os quais os Jasmonatos e outros elementos de sua família (FARMER; RYAN, 1990).

Em seu trabalho de colaboração, Farmer e Ryan propuseram que as mesmas vias estavam intimamente e condicionalmente ligadas a inúmeros fatores exógenos, como agentes ativadores do processo de biossíntese. A rota octadecanóide é a via de sinalização em plantas que culmina com a formação de ácido jasmônico, precursor de toda a família dos Jasmonatos.

Os genes envolvidos são ativados seqüencialmente a partir da injúria sofrida pelo vegetal, iniciando-se com os genes precoces após 30 minutos. Após 4 horas ou mais, ocorre a ativação dos genes tardios (RYAN, 2000). Tido inicialmente como um produto secundário das vias desencadeadas por estresse, este composto veio depois a ser considerado não apenas um agente da resposta de resistência sistêmica adquirida dos vegetais, mas também daquela induzida à distância entre indivíduos (FARMER; RYAN, 1990). Além de agentes desencadeadores de estresse de diversas naturezas produzirem a ativação da seqüência de reações de biossíntese relacionada à defesa vegetal, foi descoberta uma família de mais de uma centena de moléculas da família do Jasmonato. Parte destas moléculas, entre elas o Metil Jasmonato apresentou atividade efetora direta no sítio de produção e à distância no próprio organismo (RICHI, 2007). Um experimento elegante feito por Richi com a técnica de PET SCAN, tornou claro o registro dos efeitos destas moléculas, entre elas o Metil Jasmonato, cuja atividade efetora direta foi mostrada no sítio de produção e à distância no próprio organismo, a imagem foi reproduzida na figura 9. A produção de seiva açucarada durante a resposta ao ataque de pulgões foi associada às vias de sinalização do sistema de defesa, como uma estratégia do vegetal para atrair predadores secundários, como as formigas, que eliminam os pulgões. (RICHI, 2007).

Figura -9: Tomografia por emissão feita em folha de tabaco, depois de a mesma ser atacada por herbívoro. A parte vermelha indica a presença do Metil Jasmonato depois de vinte minutos do ataque. Fonte: Richi. F, 2007.

A indução da síntese de inibidores de proteases, por via aérea, em plantas fisicamente separadas confirmou a previsão anterior de Ryan em seus estudos sobre o PIIF. O efeito de resistência deve-se ao fato de que os insetos necessitam de proteases ativas em seu metabolismo, para que possam degradar e catabolizar a seiva das plantas e os substratos de que os herbívoros se alimentam (FARMER; RYAN, 1990). A concorrência desses efeitos está ilustrada nas figuras 10 e 11.

Figura - 10: O herbivorismo atacando a vegetação e consequentemente acionando o gatilho do mecanismo de defesa da planta. Fonte Gentilmente Cedida pela FUNAMA, 17 de Fevereiro de 2009.

Os achados de Farmer e Ryan foram referendados pelo relato sobre a liberação de um peptídeo octadecamérico altamente móvel denominado sistemina durante a resposta de células de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) à injúria e à ação herbívora. Este peptídeo mostrou-se um milhão de vezes mais poderoso do que oligossacarídeos (que atuam apenas no sítio de ataque) na indução da biossíntese de inibidores de serinoproteases em folhas de tomate lesadas (PEARCE; STRYDOM; JOHNSON, 1991). O mecanismo está esquematizado na figura 11.

Parte das respostas relacionadas à defesa contra o agente invasor leva a morte programada das células lesadas. Coletivamente, em plantas, estes fatores produzidos na cadeia de defesa vegetal, primeiramente inibem e depois impedem o potencial de colonização dos agentes invasores (SHEWRY; LUCAS, 1997; OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999).

Figura-11: O processo de indução por um agente patogênico ou herbívoro, acionando o gatilho da liberação de sistemina. Fonte Gentilmente Cedida pela FUNAMA, 17 de Fevereiro de 2009.

Em células de tabaco, foi demonstrada a interrupção do ciclo celular das células vegetais nas transições G1/S e G2/M (SWIATEK et al., 2002).

Um aspecto peculiar das respostas efectoras desencadeadas pelo Metil Jasmonato em plantas é justamente o fato de que a ativação gênica desencadeada relaciona-se à resistência a predadores, mas também à regulação do ciclo celular em tecidos

diferenciados, resultando em modificações no metabolismo e na diferenciação celular e no crescimento do organismo como um todo (DEVOTO et al., 2005)

Mais recentemente, demonstrou-se, que crustáceos detritívoros podem assumir hábitos herbívoros frente a plantas deficientes nas vias de síntese do Metil Jasmonato, sugerindo adicionalmente que estas vias podem ter sido determinantes também na evolução do comportamento de predadores em sua interação com as espécies vegetais (FARMER; DUBUGNON, 2009).

A hipótese da atividade antineoplásica do Metil Jasmonato teve origem no reconhecimento da analogia entre a sua estrutura e as suas vias de síntese com a estrutura e a rota de síntese das prostaglandinas, em mamíferos (FARMER, 1992; ROSA ; VICENTE , 2005; WASTERACK , 2007).

Ácido Jasmônico	Prostaglandinas
Vegetais	Mamíferos
Sistema desencadeia a formação do Ácido Linolênico	A histamina, a bradicinina e as citocinas podem ser os estímulos para a liberação do ácido araquidônico.
Catalisado por uma Fosfolipase A2 Na Membrana Celular Vegetal	Catalisado por uma fosfolipase A2 Na Membrana Celular Dos Mamíferos
A Fosfolipase A 2 libera O Ácido Linolênico Para O Meio Intra Celular	A Fosfolipase A 2 libera O Ácido Araquidônico Para O Meio Intra Celular
A Partir de Ácidos Graxos	A Partir de Ácidos Graxos
Sinalizador Genético, Defesa Vegetal	Sinalizador Celular, Defesa/Inflamação

Emílio Fehr/Projeto A-14

Quadro - 2: Similaridade entre as rotas dos Jasmonatos e das Prostaglandinas.

As prostaglandinas são derivadas do ácido araquidônico (C 20:4), membros do grupo de substâncias eicosanóides, que compreende também os tromboxanos e os leucotrienos. Descobertas nos anos 1930, as prostaglandinas foram isoladas de líquido seminal como uma secreção da próstata, de onde deriva seu nome. Estão presentes em todos os tecidos animais e participam da sinalização celular, importante na regulação do ciclo celular e no controle da diferenciação de diversas linhagens celulares (SUZUKI et al., 1997).

As prostaglandina e os tromboxanos são sintetizados pela ciclooxigenase (COX), em resposta a estímulos específicos. Outra enzima, a lipoxigenase (LOX), é responsável pela síntese dos leucotrienos. O ácido araquidônico é liberado *in situ* pela hidrólise via fosfolipase A de fosfolipídios, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina e corresponde ao substrato inicial das duas rotas bioquímicas, independentes. A síntese das PGs inicia-se com a COX catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar a PGG ou prostaglandina G₂. A COX atua também como peroxidase, reduzindo a PGG₂ a PGH₂. Estes dois compostos são modificados pela atuação de outras enzimas para formar todas as demais prostaglandinas (BORNE; 1999; CAMPBELL; HALUSHKA, 1996).

O efeito antineoplásico dos Jasmonatos foi verificado por Eliezer Flescher (foto na figura 12) e sua equipe, que demonstraram um efeito seletivo de indução de morte celular em células neoplásicas.

Figura – 12: O pesquisador Israelense, Eliezer Flescher, descobridor do efeito seletivo dos Jasmonatos nas mitocôndrias de células cancerígenas. Fonte: Fotografia Arquivo pessoal do mesmo.

Estudos com mitocôndrias isoladas e inibidores específicos revelaram o poro de transição mitocondrial como o alvo da ação citotóxica do Metil Jasmonato (FINGRUT; FLESCHER, 2002). O efeito demonstrou-se independente de síntese protéica (FINGRUT; FLESCHER, 2002; ROTEM et al., 2003). Esta propriedade do Metil Jasmonato assegura, ao mesmo tempo, uma seletividade da substância para as células tumorais e a possibilidade de um efeito generalizado para diversos tipos de tumores. (PELICANO et al., 2003).

1.4 O Metil Jasmonato em nanopartículas

Devido a sua natureza hidrofóbica, o Metil Jasmonato tem sido usado com cautela em experimentos *in vivo*. A estrutura oleosa da molécula dificulta a administração da mesma em formulações aquosas, como também o processo de macroencapsulamento, pelo caráter instável de sua composição em cápsulas. Pode ser preparado em propileno glicol e parafina, contudo, há que ser considerada a biocompatibilidade dos diluentes com a via de administração do preparado. O Metil Jasmonato é de densidade 0.998 g/mL em temperatura de 25 graus Celsius (SIGMA-ALDRICH CO., 2009).

O Metil Jamonato é um Ester, e sua estrutura pode ser degradada pelas esterases metabólicas o que representa uma limitação importante para a sua atuação, *in vivo*. Os experimentos de Flescher foram feitos com a molécula em culturas celulares, para que o MeJa mostrasse o seu potencial anticarcinogênico, inicialmente não sendo proposto o teste *in vivo*, (FINGRUT; FLESCHER, 2002). A proposta de nanoencapsulamento do Metil Jasmonato surgiu como possibilidade de aplicação e já é alvo de patentes em todo o mundo. Apesar disso, ainda não existe literatura sobre a biodistribuição e a farmacocinética do Metila Jasmonato puro ou nanocarreado, em mamíferos.

1.5 A importância da angiogênese no contexto das neoplasias

A compreensão da fisiopatologia da angiogênese deve bastante ao estudo dos tumores. A observação inicial de que tumores apresentam uma vascularização proeminente em relação aos tecidos normais já foi considerada como uma consequência do processo inflamatório desencadeado pela necrose focal, muito prevalente nas massas tumorais em desenvolvimento. Somente a partir dos trabalhos de Folkman, estabeleceu-se a noção de que a formação de vasos sanguíneos é um processo essencial para que a doença progrida com a produção de massas tumorais de dimensões clinicamente relevantes e de metástases locais ou à distância, e também de que é estimulada pelas células transformadas das massas tumorais (FOLKMAN; CONTRAN, 1976; FURCHT, 1986; FOLKMAN; SING, 1992).

O termo angiogênese é mais antigo. Foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman, que estudou o crescimento de células malignas heterólogas, de carcinoma de ratos, em glândulas salivares de cães. Os tumores implantados paravam de crescer após atingir um tamanho modesto.

Contudo para a surpresa de Folkman, cresciam de forma explosiva quando transportados de volta ao rato. Na busca de uma explicação para o fenômeno, Judah Folkman descobriu uma rede de pequenos vasos, no tumor reimplantado, que não ocorria no tumor de tireóide original (FOLKMAN; LONG; BECKE, 1962).

Os resultados obtidos confirmavam os achados anteriores de Harry Greene, sobre o crescimento de uma rede de vasos sanguíneos em tumores heterólogos de coelhos, quando transplantados na câmara anterior dos olhos de cobaias, a denominada angiogênese. Tumores que não cresciam, muito embora viáveis, não possuíam a formação da rede vascular (GREENE, 1941).

Folkman deduziu que a angiogênese e o crescimento do tumor fossem processos interdependentes. E postulou a inibição da angiogênese como uma possível forma de tratar o câncer (FOLKMAN, 1971). Suas idéias foram severamente criticadas, porém Folkman e seu estudante, Michael Gimbrone, em um modelo de transplante de olhos, demonstraram que células tumorais não cresciam longe de vasos sanguíneos. Em contraste, quando fragmentos do tumor eram implantados na íris, que é abundante em vasos por toda sua área, o crescimento era rápido e eficaz, independente do tumor estar num estado dormente ou em proliferação ativa (GIMBRONE et al., 1972).

Na mesma época, foi demonstrado que a estimulação tumoral não dependia de contato direto com o vaso, do tecido hospedeiro, que receberia um implante de células cancerígenas (GREENBLATT; SHUBIK, 1968; EHRMAN; KNOTH, 1968). Folkman sugeriu a existência de um fator plasmático solúvel, que poderia fazer o tumor alcançar ou ser alcançado por vasos mais próximos de sua implantação.

Folkman e seus colaboradores isolaram e descreveram um Fator de Angiogênese Tumoral (TAP), derivado do próprio tumor, que disparava a proliferação e o crescimento de capilares em pele de ratos (FOLKMAN et al., 1971).

A publicação destes resultados marcou a aceitação das teorias de angiogênese de Judah Folkman e deu início a um enorme interesse revelado pelo aumento explosivo no número de artigos publicados sobre o assunto. Em meados dos anos 80, Folkman e seu grupo descreveram inúmeros outros fatores derivados de tumores, incluindo o bFGF, o fator básico de crescimento de fibroblastos, a angiogenina, e o VEGF, o fator de crescimento vascular endotelial (FERRARA , 2002).

O Fator de crescimento endotelial, o VEGF (representado na figura 13), foi descrito como um mitógeno endotelial fisiológico. Posteriormente, o fator de crescimento vascular produzido por células tumorais (TAP), foi identificado com sendo também o VEGF (SENGER et al., 1986; FERRARA ; HENZEL, 1989 ;GOSPODAROWICZ; ABRAHAM; SCHILLING; 1989; LEUNG et al., 1989).

Figura – 13: O fator de crescimento endotelial em sua representação gráfica em terceira dimensão. Fonte: Protein Data Bank/<http://www.rcsb.org/pdb/home/home>.

O nome VEGF refere-se, atualmente, a uma família de peptídeos, cujos membros (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o PGF, ou fator de crescimento de placenta), diferem no tamanho da cadeia de aminoácidos e na afinidade por receptores tirosina-quinase específicos de superfície celular, os VEGFRs (HOUCK et al., 1991). O VEGF-A, em interação com o receptor VEGFR2, é o principal membro da família do VEGF relacionado com a angiogênese (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). A interação entre o VEGF e seus receptores está esquematizada na figura 14.

Figura-14: Esquema ilustrativo do VEGF-A encaixando-se ao seu receptor VEGFR-2, e dando início ao gatilho da angiogênese. Fonte modificada da www.researchvegf.com.

A família do fator de crescimento de fibroblastos, o FGF, é ainda mais numerosa do que a do VEGF, tem 23 membros. O FGF estimula as principais etapas na cascata de angiogênese. No entanto, o FGF somente é liberado na matriz extracelular depois que o processo de angiogênese já está em andamento. Sua função é interagir com outros fatores de crescimento e produzir ações sinérgicas sobre fibroblastos, leucócitos e endotélio (ITOH; ORNITZ; 2004; PETIT et al., 1997).

Dentre os fatores antiangiogênicos mais estudados, a família das angiopoietinas é importante como um grupo de substâncias que interagem com o VEGF, modificando a sua ação no sentido de estabilizar os vasos neoformados ou amplificar o efeito de proliferação dirigido pelo VEGF.

Em seres humanos, o receptor denominado Tie-2 interage com os três membros da família das angiopoietinas (Ang-1, 2 e 4). Cada um dos membros desta família tem um efeito diferente na interação com o receptor e ocorre mesmo um antagonismo parcial entre as angiopoietinas 1 e 2. A angiopoietina 1 está envolvida com a migração das células endoteliais, sua adesão entre si e o recrutamento dos pericitos e da musculatura lisa, para a estabilização dos vasos. A angiopoietina 2 é um fator vaso-desestabilizador, que atua em conjunto com o VEGF promovendo a proliferação endotelial (DAVIS et al., 1996; MAISONPIERRE et al., 1997).

Além de a proliferação celular ser regulada por mediadores da angiogênese, a migração de pericitos e células endoteliais responde a fatores de crescimento e mediadores inflamatórios como o PDGF e a Interleucina-8 (ARMULIK et al., 2005; LI et al., 2003).

No final do século 20, a natureza das células precursoras ganhou foco. Os embriologistas ampliaram a discussão sobre a importância dos fatores de crescimento no crescimento tumoral. No embrião, o plexo vascular primitivo se origina do mesoderma por vasculogênese. Ocorre à diferenciação *in situ* de células precursoras indiferenciadas, os angioblastos, para células endoteliais que se reúnem formando uma rede vascular primitiva (RISAU, 1997; JAIN, 1991).

Os angioblastos se diferenciam em células endoteliais, pericitos e células musculares lisas da parede vascular (YAMASHITA et al., 2000).

O plexo vascular, na sua forma inicial, consiste numa teia de tubos e sacos de células endoteliais, que sofrem remodelamento, transformando-se em uma rede vascular madura. O remodelamento envolve a formação de pequenos e grandes vasos, o estabelecimento de um fluxo direcional, a associação com células murais, também denominadas células periendoteliais (pericitos e músculo liso) e o ajuste da densidade vascular, para satisfazer as exigências nutricionais do tecido. Na fase inicial, o plexo vascular é exuberante e o ajuste final da densidade vascular envolve a regressão dos vasos desnecessários (BENJAMIN; HEMO; KESHET, 1998).

Atualmente, e desde a última década do século 20, o termo angiogênese tem sido empregado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares e para demonstrar processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular. Sabe-se hoje que a angiogênese envolve distintas formas de crescimento vascular. Elas têm início com a dilatação de vênulas preexistentes, as quais podem sofrer brotamento, ou tornarem-se divididas por colunas de células periendoteliais, processo denominado intussuscepção ou, por pontes de células transendoteliais, as quais dividem o vaso em capilares distintos (CARMELIET, 2000). No indivíduo adulto, novos vasos surgem principalmente por angiogênese (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

É consenso que as células endoteliais podem iniciar o fenômeno de formação de vasos, mas não são autônomas para completar a angiogênese. Dependem de células periendoteliais, essenciais para o amadurecimento vascular.

Essas células estabilizam o vaso nascente, através da inibição da migração e da proliferação endotelial e da produção de matriz extracelular. Elas proporcionam controle homeostático e protegem o novo vaso contra rupturas ou regressões (CARMELIET, 2000).

A mediação inicial dos processos de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular são conduzidos pelo óxido nítrico e pelo fator de crescimento do endotélio vascular, o VEGF. O VEGF é um ativador geral da proliferação endotelial e da mobilidade destas células, promove a vasodilatação e induz a permeabilidade dos vasos (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O VEGF também promove o aumento da expressão das metaloproteinases de matriz, que participam da degradação da membrana basal, e do ativador de plasmogênio, cujas ações induzem a perda de junções celulares no endotélio. (BERGERS et al., 2000). Estas modificações estruturais preparam a migração de células endoteliais que proliferam formando cordões e originam brotos vasculares. A síntese da membrana basal, a maturação e o remodelamento dos novos vasos, com o recrutamento de células perivasculares, são levados a cabo pelo endotélio dos brotos nascentes (JAIN, 2003). A cascata de efeitos que resulta na angiogênese está ilustrada na figura 14, os brotos capilares formados estão mostrados na figura 15.

Figura -14-A: Passos e etapas no processo de angiogênica.

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos produzem neovasos com razoável variabilidade morfológica e funcional, nos vários tecidos. A heterogeneidade das células endoteliais é determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos e antiangiogênicos, que atuam em conjunto (BENJAMIN; HEMO; KESHET, 1998; CARMELIET, 2000; CARMELIET, 2003).

Figura -15: Brotamento capilar: início do processo de angiogênese.

Desde o início, a angiogênese esta sujeita a um complexo sistema de controle efetuado por fatores angiogênicos e antiangiogênicos (angiostáticos).

Os pericitos também atuam no sentido de estabilizar os vasos. A estabilização depende de trombospondina, endostatina e de vários componentes da matriz extracelular. (O'REILLY et al., 1997; MAESHIMA et al., 2000). A Trombospondina -1 foi um dos primeiros agentes angiostáticos encontrados (RASTINEJAD; POLVERINI; BOUCK, 1989).

Posteriormente, a ação antiangiogênica de outras moléculas endógenas foi descritas, entre elas um fragmento da prolactina com tamanho de 16 kD (FERRARA; CLAPP; WEINER, 1991), o fator plaquetário 4, os interferons $-\alpha$ e $-\gamma$ (KOLBER; KNISELY; MAIONE, 1995; LUSTER; GREENBERG; LEDER, 1995) e as endostatinas, além de outras moléculas exógenas (O'REILLY et al., 1994, O'REILLY et al., 1997; VAN DER SCHAFT et al., 2000; MAESHIMA et al., 2000).

Muitas destas moléculas são fragmentos proteolíticos de macromoléculas endógenas cujos mecanismos ainda não foram elucidados (TABRUYN; GRIFFIOEN, 2007).

No indivíduo adulto predominam os fatores angiostáticos sobre os angiogênicos. A neovascularização só ocorre quando esta relação se inverte, e o VEGF é um mediador importante e precoce deste processo (FERRARA; HOUCK; JAKEMAN; WINER; LEUNG, 1991). Outros fatores pró angiogênicos relevantes no indivíduo adulto, são aqueles relacionados à injúria e à hipóxia: o fator de crescimento induzido por hipóxia (SHWEIKI; ITIN; SOFFER; KESHET, 1992). O fator de crescimento derivado de plaquetas (STAVRI et al., 1995), o fator de crescimento epitelial (GOLDMAN et al., 1993), angiogenina e mediadores inflamatórios (D'AMORE ; THOMPSON, 1987; PERTOVAARA, 1994; PERTOVAARA et al., 1994; LI et al., 1995; CLAFFEY; VILKINSON; SPIEGELMAN, 1992).

A representação usual do equilíbrio entre estes fatores é a dupla balança, mostrada na figura 16.

Figura-16: Balança representando o duplo equilíbrio entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Fonte modificada para o português, www.researchvegf.com

A angiogênese ocorre no sistema reprodutor feminino, em circunstâncias normais, durante a maturação do folículo ovariano, na formação do corpo lúteo, na regeneração do endométrio após o ciclo menstrual, na implantação do ovo e na formação da placenta. Além disso, é um fenômeno importante na cicatrização de feridas, na regeneração de tecidos, e no mecanismo fisiopatológico de diversas doenças. (REYNOLDS et al., 1995; BURKE; DeNARDO, 2001; CARMELIET, 2003; HOEBEN et al., 2004).

Terapias baseadas na aplicação do VEGF foram definidas para o aumento da circulação colateral em doenças vasculares (SABIA et al., 1992). A aplicação de VEGF recombinante foi proposta para promover a neovascularização após isquemia do miocárdio (BANAI et al., 1994).

Há estudos, também, em modelos da circulação pulmonar. Os pulmões contêm grande quantidade de VEGF, nas células alveolares, nos macrófagos e em células da musculatura lisa.

Foi descrito um efeito patogênico do VEGF na hipertensão pulmonar. Ocorre um aumento da expressão de VEGF, em pulmões de ratos com hipertensão pulmonar e hipóxia, e nas lesões plexiformes, em pulmões de pacientes com hipertensão pulmonar (TUDER; FLOOK; VOELKEL, 1995; TUDER; VOELKEL, 1994).

Na busca de novos medicamentos para o tratamento de tumores, além dos efeitos diretos sobre células neoplásicas, efeitos sobre a angiogênese podem ser muito promissores. Tumores expressam fatores de crescimento como o VEGF e o bFGF e quantidades aumentadas da forma induzível da ciclooxigenase (COX-2), que produz prostaglandinas angiogênicas. (FOLKMAN; CONTRAN, 1976; FURCHT, 1986; FOLKMAN; SING, 1992). A capacidade das células tumorais estimularem a angiogênese em tumores pela expressão de diferentes fatores de crescimento e a correlação entre este efeito e o crescimento do próprio tumor está representada na figura 17.

Fatores do Crescimento, Produzidos no Crescimento Tumoral.

Figura-17: Ilustração representada os fatores de crescimento endotelial entre outros, influenciando diretamente na angiogênese e subsequente crescimento tumoral.

Nas neoplasias, o crescimento da massa tumoral e a demanda por oxigênio, que inicialmente chega apenas por difusão, determinam a necessidade da formação de novos vasos sanguíneos (FOLKMAN; CONTRAN, 1976; FURCHT, 1986; WEIDEMANN; JOHNSON, 2008). Em contraste com os tecidos normais, os tumores produzem um equilíbrio onde predominam as substâncias pró-angiogênicas (BOUCK, 1990; AUGUSTIN, 1998). A angiogênese é essencial para o aparecimento de metástase através da circulação sanguínea, tanto quanto pelo sistema linfático, ocorre a partir dos vasos circunvizinhos do tecido onde se implanta o tumor (FOLKMAN; SHING, 1992).

O efeito desta ação local da massa tumoral é referendado por achados clínicos, por exemplo, o fato de que expressão tumoral de VEGF no carcinoma da mama constitui um parâmetro prognóstico mais seguro que a determinação dos níveis séricos de VEGF (CALLAGY; DIMITRIADIS; HARMEY; BOUCHIER-HAYESD; LEADER; KAY, 2000). A expressão de VEGF está relacionada com a sobrevida total e/ou com a sobrevida sem doença em pacientes com carcinoma de mama (GASPARINI, 2000).

Há muito pouco tempo a angiogênese era considerada como ocorrendo apenas nos tumores sólidos. A estreita relação entre a angiogênese tumoral e a metástase foi postulada por Weidner (WEIDNER; SEMPLE; WELCH; FOLKMAN, 1991). Diferentes tipos de tumores mostraram uma correlação direta entre a densidade dos vasos sanguíneos, no tumor primário, a evolução clínica da doença e a ocorrência de metástases. Estes estudos foram bem relatados por cânceres da mama, pulmão, próstata, cabeça e pescoço, ovário, estômago e melanoma (WEIDNER, 1995). Posteriormente foi demonstrada a importância da angiogênese na evolução de tumores hematológicos, reafirmando a generalidade dos mecanismos de angiogênese no contexto da fisiopatologia das neoplasias (DOMINICI et al., 2001; RAJKUMAR; FONSECA; WITZIG; GERTZ; GREIPPPR, 1999; VACCA et al, 1999).

É possível utilizar inibidores da angiogênese para limitar o crescimento tumoral e a formação de metástases. Efeitos sobre a angiogênese somam-se aos efeitos citotóxicos sobre células neoplásicas como alvos promissores, na busca de novos medicamentos para o tratamento de tumores (VORAVUD; CHARURUK, 1999)

e também a utilização de substâncias anti-VEGF tem sido explorada (GASPARINI, 2001).

A atividade da ciclooxigenase, particularmente de sua isoenzima indutível conhecida por COX-2, é bastante relevante à angiogênese relacionada ao ambiente tumoral. As COX-1 e -2 são enzimas responsáveis por formar diversos mediadores biológicos a partir do ácido araquidônico. Das isoformas conhecidas, a COX-1 é constitutiva em quase todos os tecidos. (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006; PAI et al., 2002; DUBOIS et al., 1998).

A COX-2, pouco expressa em tecidos normais, é induzida por vários estímulos, dentre os quais o Fator de Necrose Tumoral, o $TNF\alpha$ e outros mediadores da inflamação. A COX-2 foi detectada em células epiteliais, endoteliais e células estromais de vários tumores. (PATRIGNANI et al., 2005). Os principais produtos derivados da ação da COX são as prostaglandinas D2, E2, F2a, I2 e o tromboxano A2, esquematizados na figura 18.

Alguns dos efeitos dessas substâncias sobre a carcinogênese estão mencionados no quadro 3.

Figura - 18: Esquema da formação das prostaglandinas e das Co-enzimas Cox-1 e Cox-2, a partir do ácido araquidônico.

Papel das Prostaglandina em Vários Passos da Carcinogênese				
Passos na Carcinogênese	O Envolvimento da COX e da Prostaglandina			
Proliferação Celular	PGI ₂	PGE ₂	PGD ₂	PGF ₂
Angiogênese	COX-2	TXA ₂	PGI ₂	PGE ₂
Apoptose	COX-2	PGE ₂		
Imunomodulação	PGE ₂			

Quadro-3: esquema ilustrativo do envolvimento das prostaglandinas e das co-enzimas Cox -1 e Cox-2, no processo carcinogênico.

Especialmente a prostaglandina E_2 , PGE_2 , é um agente regulador de vários aspectos da progressão tumoral e da cascata metastática. Os efeitos das prostaglandinas foram inicialmente atribuídos ao seu poder vasodilatador e antitrombolítico (OLIVA; NICOSIA, 1987).

Posteriormente, foi demonstrado que as prostaglandinas E_1 e E_2 aumentam a produção de VEGF em osteoblastos (HARADA et al., 1994), em células leucêmicas humanas e pulmão de ratos (MARIUS et al., 1997). De fato, a PGE_2 estimula diretamente a angiogênese ou é o agente sinalizador de vias pró-angiogênicas, incluindo estímulo à expressão de FGF e VEGF (WANG; DUBOIS, 2004; MAJIMA et al., 2000). Muitos modelos experimentais de tumores *in vitro*, como o do câncer de mama, apresentam expressão elevada da COX-2 entre outras proteínas que contribuem para o comportamento maligno do tumor (RISTIMAKI et al., 2002).

O câncer de mama humano apresenta-se com produção aumentada de prostaglandina E_2 em relação aos tecidos normais, e tumores com alta quantidade de COX-2 têm maior propensão à metástase (RISTIMAKI et al., 2002). Estudos epidemiológicos estabeleceram uma correlação entre o uso crônico de antiinflamatórios não esteróides, que são inibidores das Coenzimas COXs e a menor incidência de certos tipos de tumores, incluindo o câncer de mama (HARRIS et al., 2003).

O receptor EP4 de PGE_2 participa do estágio inicial da carcinogênese tanto em cólon como em mama (MUTOH et al., 2002; POZZI et al., 2004; KAWAMORI et al., 2001; TIMOSHENKO et al., 2003; BUCHANAN et al., 2003; BUCHANAN et al., 2006).

Efeitos de proteção, com o uso de inibidores da COX, já foram relatados na literatura (LALA; PARHAR; SINGH, 1986; MASFERRER et al., 2000; KUNDU ; FULTON, 2002; SHENG et al., 1998).

Existem vários inibidores de angiogênese atualmente em ensaios clínicos para o tratamento de tumores. O Avastin, aprovado pelo FDA para o tratamento de câncer de cólon foi a substância que inaugurou a terapia antiangiogênica, idealizada a partir dos trabalhos de Folkman. (DIAZ-RUBIO et al., 2005).

1.6 Alvos moleculares da terapia antiangiogênica

As estratégias para o uso terapêutico dos bloqueadores do processo da angiogênese têm sido amplamente discutidas. O bloqueio da ligação do VEGF-A ao receptor VEGFR2 tem sido o alvo mais persistente dos estudos mais recentes. Contudo, os efeitos clínicos indesejáveis são bastante preocupantes.

Efeitos tais como: perfurações gastrointestinais, eventos tromboembólicos e ferimentos que não cicatrizam decorrem do bloqueio do VEGF-A junto ao receptor VEGFR2 (FERRARA ; KERBEL, 2005).

Problemas visuais e neurológicos têm surgido em pacientes com o uso prolongado do Avastin, e ainda demandam investigações para esclarecer os mecanismos de seu aparecimento (GLUSKER; RECHT; LANE, 2006; OZCAN; WONG; HARI, 2006).

Existem outros alvos em estudo, como o bloqueio do receptor R1 do VEGF, e as vias dependentes de outros fatores de crescimento, como o VEGF (ALITALO; TAMMELA; PETROVA, 2005).

Uma droga antiangiogênica reduz a perfusão dos vasos, porém este fenômeno tem como consequência, o aumento da resistência à quimioterapia, comprometendo a estratégia do tratamento baseado num único mecanismo (VAUPEL; THEWS; HOECKEL, 2001). Os mecanismos de indução de resistência aos diversos agentes disponíveis são a seleção de células mais resistentes a hipóxia e, por isso mesmo, menos dependentes da angiogênese (YU et al., 2002).

Da perspectiva atual, o VEGF representa a primeira estratégia bem sucedida de um mecanismo de antiangiogênese para o combate ao câncer. Já se publicam ensaios discutindo que mesmo se o bloqueio do VEGF, não trará a cura ansiada a partir dos estudos iniciais, deve ser um coadjuvante de tratamentos mais promissores, dirigidos a múltiplos alvos (EPSTEIN, 2007). A etapa do crescimento tumoral permite que haja prováveis estudos de novas drogas anti-VEGF. Esta evolução da massa neoplásica está representada nas figuras 19 e 20. A interação do VEGF com o receptor na superfície dos vasos está representada na figura 21.

Figura -19: Ilustração mostrando a evolução da massa tumoral quando a mesma atinge um diâmetro acima de dois milímetros. Emory – Cancerquest. Modificado em fotogramas de animação gráfica em terceira dimensão. The VEGF History.

Figura -20: Ilustração demonstrativa da evolução tumoral, quando o tumor passa a crescer acima de dois milímetros de diâmetro, ocorre a produção do fator de crescimento, VEGF, para a formação de novos vasos, a partir dos já existentes, cujas funções serão de aumentar a oferta de oxigênio e nutrientes, a fim de suprir a necessidade da massa crescente. Emory – Cancerquest. Modificado em fotogramas de animação gráfica em terceira dimensão.

Figura -21: Ilustração demonstrativa da evolução da formação de novos vasos, a partir dos já existentes, com a liberação de VEGF e do encaixe do mesmo, nos receptores, encontrado nas células endoteliais dos vasos, e após o devido acoplamento da proteína, as transformações iniciadas a nível estrutural dos vasos. Emory – Cancerquest. Modificado em fotogramas de animação gráfica em terceira dimensão.

1.7 Nanotecnologia, angiogênese e câncer.

A questão envolvida no desenvolvimento de terapias onde agentes antiangiogênicos possam evitar o crescimento de vasos, em condições patológicas a qual se encontra o desequilíbrio entre a angiogênese e os seus fatores de inibição é uma questão importante. Trata-se de prover a adequada distribuição desses agentes, localizando seus efeitos onde se faz necessário, pois seus alvos encontram-se dispersos por todo o organismo e são alvo de ações locais e interreguladas de fatores endógenos pró- e antiangiogênicos.

Assim, a entrega dirigida ao alvo, no caso desses agentes, aumenta a eficácia teórica de uma formulação neles baseada, diminui efeitos colaterais diretos e indiretos e pode ser inclusive, o fator decisivo para a ocorrência do resultado clínico.

Outro fator a ser considerado é que, muitas substâncias com potencial terapêutico perdem a sua atividade porque são biotransformadas e eliminadas rapidamente ou porque são destruídas pelo catabolismo dos organismos vivos. O uso de carreadores, coadjuvado por uma melhor compreensão da ação dos mesmos, permite projetar moléculas e estruturas supramoleculares de ação seletiva, as denominadas drogas inteligentes, ou drogas de terapia de alvos específicos.

Há mais de duas décadas, a literatura científica tem apresentado artigos sobre carreadores de drogas para alvos específicos, como o câncer, evitando a atuação de drogas muito tóxicas, como quimioterápicos em tecidos sadios. Especificamente no caso dos tumores sólidos, o processo da angiogênese tem um papel crucial tanto para o desenvolvimento dos tumores quanto para o controle da administração de medicamentos aos alvos desejados

Existem muitas barreiras em potenciais que dificultam a entrega da droga em sua forma ativa em tumores sólidos. Para que ocorra uma circulação da droga, o seu carreador tem que ser inócuo e resistente a degradação pelos componentes do plasma. O tamanho ideal destes carreadores, tem se revelado como sendo um dos fatores decisivos aos alvos que se deseja atingir com a administração da droga. Os agentes moleculares de menor estrutura têm uma ampla distribuição quando os administrados pela via intravenosa (SPETH; VAN HOESEL; HAANEN, 1988).

Vários veículos carreadores já foram estudados e patenteados.

A distribuição em carreadores chega a aumentar significativamente a concentração de medicamentos nos alvos desejados, permitindo assim, uma significativa queda da toxicidade, com o aumento da concentração e da eficácia em relação ao composto não carreado. Um dos mais simples, antigo e amplamente estudado são os lipossomos (esquematisados na figura 22). Estes carreadores, por exemplo, podem distribuir substâncias bioativas de natureza hidrofílica ou hidrofóbica. (MARTIN, 1998).

Em uma situação ideal, um composto é carreado enquanto circula na corrente sanguínea, porém libera-se do carreador ao chegar a seu alvo. Os lipossomos protegem a droga do metabolismo fisiológico e a sua possível inativação, ainda no plasma e são capazes de permear a parede vascular para chegar a seus sítios de ação (MAYER et al., 1989; WORKING et al., 1994).

Figura -22: Ilustração esquemática da estrutura do lipossomo, mostrando o compartimento aquoso interno e a bicamada hidrofóbica. Ilustração livre da localização provável do MeJa, associado às superfícies da bicamada, nos lipossomos preparados com fosfatidilcolina purificada de ovos.

Os vasos tumorais são geralmente mais frestados do que os normais, um aspecto da descontinuidade da parede vascular está mostrado na figura 23. A concentração de macromoléculas é grande em tumores, esta característica é favorecida pela qualidade dos vasos, frestados, permitirem a passagem das mesmas para o meio extracelular, além do fato do sistema de defesa imune associado ao tumor estar funcionalmente deficiente, inibido pelo tecido tumoral (MAEDA, 2001). A permeabilidade aumentada está mostrada na figura 24.

Figura -23: Vasos frestados no ambiente tumoral, com a potenciabilidade de formação de processo metastático devido à facilidade de migração de células neoplásicas, disseminadas em torno dos vasos.

Os vasos frestados presentes em tumores, permitem aos lipossomos, extravasar com abundancia para o meio intersticial, podendo os mesmos permanecer de maneira prolongada no tecido neoplásico. Além disso, o metabolismo tumoral também demanda uma ativa utilização de substratos lipídicos e resulta em uma maior depuração de partículas e lipoproteínas. Estes efeitos ampliam a seletividade dos lipossomos para tumores. Qualquer que seja o lipossomo, ele tem que ser estabilizado na corrente sanguínea, pra que o balanço entre carregamento e distribuição não seja afetado no tecido alvo (JAIN, 2001).

Figura-24: Massa tumoral em torno do grande vaso, com extravasamento de células e substâncias não meio extracelular.

Nas circunstancias ideais, os lipossomos são estáveis retendo a droga carregada e entregando-a no sitio alvo. No entanto, são pouco seletivos, para alvos diferenciados e podem ser desestabilizados *in vivo*, pelo metabolismo de diversos tipos celulares. (JAIN, 2001).

O tamanho do lipossomo correlaciona-se com a sua vida útil na corrente sanguínea. Conforme ocorre o aumento tamanho dos lipossomos, o seu tempo de vida útil diminui. O tamanho ideal encontrado de lipossomos para circulações de longo alcance é 114.3 nm (KAWAHARA et al., 2003).

A produção de lisossomos menores é um trabalho delicado, porém estes tamanhos de nanocarreadores, evita contaminação por agentes patogênicos que possam ser levados aos tecidos junto com as substâncias carregadas (NALLAMOTHU, et al., 2006).

Outros tipos carreadores têm sido citados por vários autores, como sendo ideais para carregamento de fármacos, contudo nos últimos anos, a literatura tem deixado claro que existe em todos os carreadores, uma diversidade de efeitos benéficos e também de efeitos tóxicos. Os estudos para possibilitar o uso de carreadores como veículos para substâncias terapêuticas, devido aos efeitos tóxicos inerentes a cada formulação devem considerar, adicionalmente, o tipo de patologia a ser tratada e a interação entre os mecanismos de toxicidade.

1.8 A Nanotecnologia e as Ciências dos materiais aplicadas ao desenvolvimento de medicamentos

A preocupação com o desenvolvimento de novos materiais para as terapias assim dirigidas a grupos particulares de indivíduos e suas peculiaridades, desencadeou, nos últimos anos, uma nova revolução no sistema de engenharia de materiais, referente à criação de novas partículas, tendo a medicina como um de seu principal alvo. A nanotecnologia e a biotecnologia são ciências que se tornam complementares entre si, e com a engenharia de materiais, oferece a base para o

desenvolvimento de uma grande variedade de produtos, de diversas naturezas, com diâmetros na ordem de décimos de nanômetros (GLEN, 2005).

A Engenharia permitiu o aprimoramento de técnicas para melhor caracterização de partículas que pudessem carrear drogas ou substâncias para receptores específicos. Nesta escala, possibilitou que a biotecnologia aprofundasse os estudos em receptores e mediadores biológicos. Com esta participação, possibilitou o desenho de estruturas, um exercício requintado, que ampliou as possíveis aplicações e o controle da física estrutural de polímeros e biopolímeros. Projetos específicos foram criados para serem usados como veículo de drogas, combinando a utilização de princípios e técnicas de biotecnologia para a manipulação de moléculas, estruturas genéticas e celulares. A proposta de manipulação celular aprofundou a interdisciplinaridade no desenvolvimento de estratégias para combater patologias incuráveis como o câncer e algumas doenças autoimunes (ROCO; WILLIAMS; ALIVISATOS, 2000). Os carreadores na escala nanométrica podem vencer as resistências oferecidas pelas barreiras fisiológicas do corpo tornando-se eficazes para a entrega dos fármacos, controlada pelo tamanho estrutural dos mesmos. (KIPP, 2004).

A viabilidade de carrear compostos hidrofóbicos e o desenvolvimento de aplicações de liberação controlada refinou os protótipos, bem como a ampliaram o elenco de nanocarreadores desenhados para utilização *in vivo*. (OULD-OUALI et al., 2005; ARBOS et al., 2004; DUBIN, 2004).

Novos protótipos sintéticos de carreadores foram trabalhados e a engenharia modificou as superfícies destes nano invólucros, para que fosse ainda mais específica a entrega destas nanomoléculas aos alvos desejados, objetivando o

escape do sistema imune e o aumento na especificidade a receptores e ambientes endógenos (COHEN et al., 2000; LOBENBERG; KREUTER, 1996).

É neste contexto que se desenvolveu este trabalho. O Metil Jasmonato é um composto de origem vegetal, com efeitos já descritos e que permitiam supor aplicabilidade clínica, mas cujas características físico-químicas vinham dificultando o desenho de estudos experimentais *in vivo*. A possibilidade do uso de diferentes formulações, desenhadas, e anteriormente patenteadas para fins de pesquisa e uso em medicamentos, com a apropriação das novas tecnologias e o estudo de alvos alternativos no estudo de substâncias com atividade antitumoral providenciou mais do que o refinamento de formulações, como inicialmente esperado.

Como em tantas outras frentes de investigação alimentadas pelas ferramentas oferecidas pela Bioengenharia e pelos novos bioagentes, avançou-se na compreensão de mecanismos de ação do composto, na ampliação da proposta de seu uso clínico e no desenvolvimento de modelos biológicos para o teste de novos materiais.

2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi verificar se a citotoxicidade do Metil Jasmonato, descrita como seletiva para células neoplásicas, pode ser estendida também para células endoteliais e ter efeitos sobre a angiogênese.

2.1 Objetivos Específicos:

Verificar os efeitos do Metil Jasmonato sobre o crescimento de células endoteliais em cultura e compará-los aos resultados descritos na literatura para linhagens de células tumorais *in vitro*.

Descrever os efeitos do Metil Jasmonato sobre o crescimento de vasos em um modelo de angiogênese embrionária *in vivo*.

Identificar efeitos da associação do Metil Jasmonato a nanocarreadores sobre a sua atividade nos modelos de angiogênese *in vitro* e *in vivo*.

Desenvolver, a partir do modelo de angiogênese embrionário, um modelo experimental de metástase e crescimento tumoral *in vivo* que possibilite estudar os efeitos de Metil Jasmonato sobre a angiogênese em ambiente tumoral.

3 Estratégia

1. Estabelecer um método analítico para o Metil Jasmonato que permita determinar concentrações do composto em diferentes veículos.

2. Caracterizar a citotoxicidade de Metil Jasmonato, em solução aquosa ou associado à nanocarreadores, para células endoteliais em cultura, comparar os resultados obtidos com a citotoxicidade para células de melanoma B16 -F10, como modelo de células tumorais susceptíveis ao Metil Jasmonato. Verificar efeitos de formulação em modelos simples de nanocarreadores.

3. Estudar os efeitos do Metil Jasmonato, em solução aquosa ou associado à nanocarreadores, sobre a angiogênese em um modelo experimental de angiogênese embrionária, *in vivo*.

4. Estabelecer um modelo experimental de metástase e crescimento tumoral, *in vivo*, que permita estudos de angiogênese em ambiente tumoral.

5. Verificar se os efeitos do Metil Jasmonato, puro ou carregados, sobre a angiogênese podem ser estendidos para o ambiente tumoral, no contexto do modelo experimental desenvolvido.

4 Materiais e Métodos

4.1 Análise de Metil Jasmonato

Este estudo foi feito no Laboratório de Análises Toxicológicas, pela Dra. Daniela Mendes Louzada, da FCF-USP. O Metil Jasmonato ou metil (1R, 2R)-3-Oxo-2-(2Z)-2-pentenil-cyclopentanoacetato (metildihidroxijasmonato 96% Sigma Aldrich – Missouri – USA), fórmula: $C_{13}H_{22}O_3$ e peso molecular de 226.31, foi diluído para uso em n-hexano ou etanol absoluto (Merck) e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-MS), como descrito (MUELLER et al., 2006).

Amostras de material biológico associado ao Metil Jasmonato foram extraídas com n-hexano P.A., na proporção de 1:10 v/v. A extração líquido-líquido foi conduzida sob agitação em vórtex Phoenix AP56 durante 1min, depois a amostra foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm em uma microcentrífuga. A fração orgânica contendo o Metil Jasmonato foi coletada e seca sob fluxo de nitrogênio, o extrato seco foi redissolvido em etanol absoluto e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). As condições de medida no cromatógrafo Focus com espectrômetro de massa PolarisQ do tipo ion trap e injetor automático TriPlus foram as seguintes: Volume de amostra: 1 μ L; Temperatura do injetor: 250°C; Modo de injeção: splitless; Fluxo de hélio: 0.6ml/min;

José Emílio Fehr Pereira Lopes

Rampa cromatográfica: início a 100°C durante 1 minuto, inclinação de 10°C/minuto até 300°C, patamar de 300°C, mantido por 4 minutos; Tempo de corrida: 24.50 minutos; Temperatura da linha de transferência: 250°C; Temperatura do detector: 200°C; Espectrômetro de massa: modo Full scan – m/z: 50-400. O espectro obtido foi comparado com relatos de literatura (SCHMELZ et al., 2003; MUELLER et al, 2006)

4.2 Preparo de lipossomos de fosfatidilcolina de ovo

Os lipossomos foram preparados com fosfatidilcolina de ovo (purificada no laboratório de Sistemas Biomiméticos do IQ-USP e gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia) na concentração de 30 mM, em solução aquosa. Foram realizadas 11 etapas de extrusão através de membranas com poros de 100 nm e 50 nm, utilizando um extrusor de seringa Avanti Polar Lipids, a temperatura ambiente. Esta etapa da preparação está mostrada na figura 25. O tamanho das partículas na suspensão foi acompanhado por medidas de espalhamento de luz.

Figura -25: Extrusão dos lipossomos, feitos a partir de fosfatilcolina retirada de ovos.

4.3 Incorporação de Metil Jasmonato aos lipossomos

A um volume de 500 μL da suspensão de lipossomos foi adicionado o Metil Jasmonato na concentração de 4 mg/mL . A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 15 minutos, e incubada a 4°C por 72h. A preparação foi então dialisada duas vezes contra 200 ml tampão estéril. A emulsão dialisada foi analisada por CG-MS, para determinação da quantidade de Metil Jasmonato remanescente na preparação.

Outra molécula incorporada com Metil Jasmonato, denominada A-14, patenteada e cedida gentilmente para este experimento, pela Nanocore, Nanotechnology Cooperative Research.

Esta molécula carreadora é um carboidrato complexo rígido, formado por unidades de moléculas de glicose, ligadas entre si por ligações alfa 1,4, e cuja estrutura foi modificada, para que houvesse aumento da sua solubilidade em meio aquoso. Esta nanomolécula foi testada nos ensaios com as células em cultura, somente para comparação dos seus efeitos sobre a angiogênese e sobre o crescimento da linhagem neoplásica usadas neste experimento, com o MeJa puro e nanocarreado em lipossomos. Os métodos de carregamentos e da composição de nova molécula não foram tema deste trabalho experimental, em nenhum estágio desta tese, visto que os mesmos já são patenteados ou descritos na literatura.

4.4 Estudo da citotoxicidade do Metil Jasmonato em cultura de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) e de melanoma murino (B16 -F10) (DENIZOT; LANG; modif, 1986).

Para ambos os ensaios, as células foram cultivadas em meio RPMI contendo soro fetal bovino em placas de 96 poços. Tipicamente foi utilizada a concentração inicial de 1×10^4 células/mL, para ambas as células. Ensaios com as HUVECs em

condição de confluência foram realizados com inóculos de 2×10^5 células/mL. O procedimento está mostrado nas figuras 26 e 27.

Figura - 26: Semeadura das HUVECs em placas de 96 poços durante a execução do ensaio do MTT para estudo da citotoxicidade do MeJa.

Em cada poço, foram inoculadas as células, a partir de uma alíquota de 200µl, cultivadas durante 3h a 37°C, em 5% de CO₂ para aderência e carenciadas por substituição do meio por 150µl de meio sem soro. A seguir foi adicionado um volume de 50 µl de meio contendo Metil Jasmonato livre ou associado aos lipossomos. O mesmo processo foi feito com a nanomolécula A-14.

Figura - 27: Procedimento de exposição das HUVECs ao MeJa durante o ensaio do MTT, ao final da etapa de carenciamento de soro.

Para o ensaio do MTT, as células foram incubadas por 24 h. O meio foi removido por imersão e depois foi adicionado 50 μ L de MTT (1mg/mL) em meio RPMI livre de vermelho fenol. As placas foram agitadas por 3h e o meio foi removido por inversão. Em seguida, foi adicionado um volume de 100 μ L de DMSO e a mistura foi incubada por 30 min, sob agitação, para que a formazana formada fosse dissolvida no DMSO.

A leitura, espectrofotométrica foi feita em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 580 nm. Os controles processaram-se como as amostras, excluindo-se o Metil Jasmonato.

Para a avaliação das curvas de crescimento celular, as células foram incubadas por 96h e a exposição foi feita em meio contendo 10% de soro fetal bovino.

As medidas foram efetuadas em duplicatas independentes a cada 24h, após a exposição, um poço diferente sendo utilizado para cada replicata, em cada tempo de avaliação. Para cada medida, o meio de cultura foi aspirado dos poços e as células foram lavadas com um volume de 200 μ L de solução salina. Depois, a solução salina também foi removida e foi adicionado um volume de 10 μ L de meio sem soro contendo tripsina, para que as células se desprendessem do fundo da placa.

Após cerca de 5 min, padronizados para cada lote do preparado contendo a enzima, as células foram coletadas pela adição de 90 μ L de meio com soro para tubos plásticos de 500 μ L e adicionadas de 5 μ L solução isotônica de Azul de Tripán. A concentração celular em cada alíquota foi avaliada por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, num microscópio ótico Zeiss JenaMed em montado para observação em campo claro. Cada amostra foi contada num volume de 0,4mm³, em duplicata. Quando ocorreu discrepância entre as contagens ou foi observada a presença de agregados celulares, a contagem foi feita em triplicata ou quadruplicata. Como cada replicata, resultou da coleta da cultura celular de um poço independente, a interferência da eventual presença de agregados pode ser controlada sem muita dificuldade.

A agregação pode ser identificada pela observação das culturas em placas ao microscópio invertido. Este procedimento de inspeção, ilustrado na figura 28, foi rotineiramente realizado antes do fracionamento das culturas em alíquotas para a realização dos ensaios e manutenção das culturas.

Figura - 28: Observação da morfologia das células na cultura estoque, em garrafas, antes do preparo de alíquotas para observação da viabilidade e para a realização dos diversos ensaios. Aspecto da sala de cultura com o microscópio invertido e a bancada de trabalho. No contra-plano encontra-se o fluxo laminar e a estufa de CO₂ que não são vistos na foto.

4.5 Estudos do mecanismo de ação do Metil Jasmonato sobre as células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC)

Os efeitos do Metil Jasmonato sobre a fisiologia celular foram estudados por morfologia, pela medida do VEGF produzido e por citometria de fluxo. A morfologia foi analisada em culturas celulares realizadas sobre lamínulas redondas com 13 mm de diâmetro (Glasstécnica) em placas de 24 poços, num volume de 0,5 mL. A ação do Metil Jasmonato sobre a morfologia celular foi estudada em culturas de HUVEC e também de melanoma B16-F10. Em cada poço, 5×10^4 células/ml foram cultivadas por 3h a 37°C/5% de CO₂ para aderência e carenciadas por substituição do meio por 150 µl de meio sem soro. Foram então expostas ao Metil Jasmonato dissolvido em meio contendo soro fetal bovino 10%. Ao final de 60h as lamínulas foram removidas dos poços, fixadas em metanol e coradas com o corante panótico seqüencial: “Instant Prov” - (Newprov), segundo as instruções do fabricante.

Os estudos dos efeitos sobre o ciclo celular e sobre a produção de VEGF foram feitos apenas com as HUVECs. A produção do VEGF foi medida por um teste ELISA comercial (BD), segundo instruções do fabricante. Estas medidas foram gentilmente realizadas pela Mestranda Priscila di Napoli, do CINTERGEN - UNIFESP, que forneceu os resultados para este trabalho.

A ocorrência de autofagia e a observação do ciclo celular foram feitas por Citometria de Fluxo em um equipamento FACScalibur, após marcação com Laranja de Acridina e com Iodeto de Propídio. Esses dois corantes marcam, respectivamente, os compartimentos ácidos presentes na célula e o material nuclear íntegro. Estes ensaios simples foram utilizados para se obter evidências da ocorrência e dos mecanismos envolvidos na morte celular. As células foram cultivadas na presença do Metil Jasmonato por 18h em três garrafas de 25 ml, para cada ensaio. Após o tratamento, meio de cultura foi retirado das garrafas e reservado, as células foram removidas com Tripsina e um fluxo de PBS e reunidas numa suspensão comum. A suspensão em PBS foi adicionada ao meio previamente reservado e centrifugada a 300g por 3 min. O botão de células resultante foi ressuspenso em 6 mL de PBS e separado em duas alíquotas de volumes aproximados de 2 mL e 4 mL, respectivamente para a marcação com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio. Para a marcação com Iodeto de Propídio, a alíquota de 4 mL da suspensão celular foi novamente centrifugada a 300 g por 3 min; o sobrenadante foi descartado e as células ressuspenso em 500 µL de PBS e mantidas no gelo por 5 a 10 min. Depois de gelada a suspensão, um volume de 500 µL de Etanol absoluto gelado foi pipetado rapidamente e misturado com fluxo de bolhas ar feitas com uma pipeta Pasteur sobre a suspensão, para fixar as células. A suspensão foi deixada no gelo por 15 min. Os debris foram removidos por centrifugação a 300g por 3 min, depois de disposta cuidadosamente com uma pipeta Pasteur, uma subcamada de 1mL de soro fetal bovino gelado, que não deve misturar-se com o álcool.

Após a centrifugação, o líquido foi aspirado cuidadosamente, tomando-se o cuidado de não desfazer o botão de células. A parede do tubo foi limpa com um cotonete para remover os completamente os debris celulares e o tubo foi adicionado de 500 μ L de PBS/RNase (0,1 mg/ml concentração final), vortexado e incubado por 15 min em banho a 37°C. Após este período, a suspensão foi retirada do banho, adicionada de 5 μ L de uma solução de Iodeto de Propídio, 5 mg/mL, agitada em vórtex e incubada por 30 min à temperatura, ao abrigo da luz. A leitura no citômetro foi feita em, no máximo, 2h. A aquisição considerou a população total e foi representada num gráfico (linear x log) do número de eventos contra a intensidade da marcação pelo Iodeto de propídio. Para a marcação com o Laranja de Acridina, as células contidas no volume de 2mL da suspensão foram centrifugadas a 300g por 5 min e lavadas mais uma vez, com 5mL de PBS. Novamente centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspensas em 300-400 μ L de Laranja de Acridina 0,1 μ g/ mL, foram incubadas por 15 min ao abrigo da luz na temperatura ambiente. A aquisição no FACS para leitura da marcação foi feita em FL1 e FL3, escala linear, contados 10000 eventos totais, posteriormente representados em gráfico de pontos (Dot Plot FL1/FL3). Os controles neste ensaio têm tipicamente de 6 a 7 % de positividade.

4.6 Estudo de angiogênese *in vivo*, no modelo da membrana corioalantóica de embrião de galinha

Foram utilizados ovos de *Gallus Domesticus*, raça Bovans White com idade aproximada de 240 dias, provenientes da Granja Kunitomo, localizada na estrada Mogi - Salesópolis, Km 12 em Suzano-São Paulo. Os ovos brancos de peso médio de 60,1 g foram trazidos diretamente da granja, de 26 a 34 h após a postura e incubados numa chocadeira termostatizada da marca Zagas, com capacidade para 120 ovos, cedida pelo fabricante para uso no laboratório e mostrada na figura 29.

A chocadeira foi nos cedida pela Zagas Chocadeira Ltda, para o uso exclusivo destes experimentos. A máquina feita com madeira de pinho possui capacidade para 120 ovos de galinha. A incubadeira é automática, e através de um termostato a temperatura é cuidadosamente controlada como também a umidade geral dentro do recinto incubatório.

Figura-29: Chocadeira usada no experimento dos ovos.

Existe também um motor acoplado a sua estrutura cuja função faz com que os ovos que estejam sendo incubados, sejam virados a cada 6 horas, num procedimento conhecido entre os avicultores como rolagem ou viragem automática dos ovos. Este processo é para que o ovo receba o calor por inteiro evitando assim, que o embrião cresça somente de um lado do ovo, podendo ficar com a membrana aderida ao lado o qual ficou faceado recebendo o calor, resultando com a morte embrionária ou tendo o seu desenvolvimento totalmente comprometido. O embrião tem seu início de desenvolvimento voltado ao lado onde incide a maior intensidade de calor.

A gema do ovo tem o potencial de mover-se fazendo um giro em torno de si mesmo, permitindo expor o disco germinativo do ovo, para receber a energia aquecida, como ilustrado na figura 30.

Isto ocorre no processo de incubação natural, onde as aves fazem estes movimentos sobre seus ovos de com ajuda dos pés e pernas, enquanto deitados sobre os mesmos, em seus ninhos.

Figura -30: Ilustração do embrião desenvolvendo-se na face voltada a fonte de calor.

O calor é produzido por resistências elétricas, que estão na parte superior da maquina, acima da bandeja, onde os ovos ficam deitados, cuja base deste suporte é feito com uma tela que engrenada com o motor externo, promove a viragem automática dos ovos, em movimento de rotação de 90 graus à direita e depois à esquerda continuamente.

Na parte inferior da chocadeira, abaixo da bandeja de suporte dos ovos, existem dois recipientes de plásticos rígidos, que foram desinfetados anteriormente, secos e depois colocados água nos dois recipientes. A cada dois dias, com o propósito exclusivo de manter a umidade interna adequada ao desenvolvimento embrionário, estes mesmos recipientes foram lavados e tiveram sua água trocada. O processo de incubação é uma das partes que deve ser melhor consideradas, uma vez que o ovo é objeto de seu experimento, depende de um longo período, e frágil, de incubação para que haja o efetivo desenvolvimento do embrião. Se o mesmo não for feito de forma segura e controlada dentro dos padrões estabelecidos na literatura e pelos avicultores, pode ocorrer um atraso considerado no processo de eclosão da ave.

O descontrole ou desequilíbrio entre a temperatura e a umidade do ambiente intra-incubatório, também leva a má formação do embrião e uma quantidade razoável de natimortos. Devendo-se, portanto, desinfetar a máquina pelo menos 12 horas antes do início de seu uso. O calor interno proposto para um eficaz desenvolvimento do embrião é a mesmo, ou seja, a temperatura é mesma padronizada das estufas usadas para o cultivo, crescimento de células e de bactérias. Consequentemente, o ambiente interno da chocadeira é ideal para o crescimento de microorganismos que podem de forma direta ou até mesmo indiretamente interferir no processo do desenvolvimento do embrião e seus anexos.

Figura -31: Ovos de Gallus Domesticus, sendo incubados na Chocadeira Zagas, cedida por cortesia pela: Zagas Chocadeira Ltda. – São Paulo – São Paulo.

A temperatura foi controlada pelas resistências elétricas que ficam na parte superior da máquina e a umidade, garantida nos recipientes de plástico rijo. Estes recipientes devem conter somente água limpa, sem químicos, para que ocorra a evaporação. Estes reservatórios devem ser postados abaixo da plataforma de tela onde os ovos ficam deitados imóveis, como mostrados na figura 31.

A máquina foi previamente limpa e borrifada com solução de timerosal a 5%, doze horas antes do início da incubação, para evitar a contaminação dos ovos. Alguns autores aconselham desinfetar a incubadeira, com fumigação com formaldeído 10% e permanganato de potássio. Porém, outros autores de literatura de produção avícola artesanal e industrial, condenam este processo, alegando que as moléculas eleitas a este feito podem produzir efeitos tóxicos residuais que afetaria o embrião na fase inicial de seu desenvolvimento.

Tendo em vista que é neste período que necessitaríamos de todas as informações do processo de angiogênese. É a partir do quarto dia que este fenômeno inicia-se sobre a membrana corioalantóica do embrião de galinha, não elegemos o processo de fumigação e sim, a limpeza manual de por borrifação de anticéptico, solução de timerosal a 5%, indicado pelo fabricante da máquina cedida para os nossos experimentos. Os anexos e bandejas, antes de receberem o desinfetante, foram lavados com água e detergentes, para que possíveis colônias fúngicas fossem descoladas e desagregadas da parede do material do recipiente. Os anexos foram secos totalmente antes de receber o agente bactericida.

A máquina foi colocada dentro do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Cidade Universitária, Bloco17. A incubadeira foi postada sobre uma estante, com ventilação ampla situada em um corredor, distante da porta de entrada ou de saída, evitando fluxo direto da corrente de ar. Os orifícios situados acima do aparelho incubatório são usados na ventilação. O sistema de ventilação chocadeira é outro item que tem que ser levado em consideração e com muita atenção. Na face superior da máquina existem dois pequenos orifícios, vedados com um filtro circular, permitem a ligação do meio interno da chocadeira com o meio externo do ambiente. O propósito deste orifício é a para que ocorra a aeração, ou seja, é por onde o ar entra e percorre, por diferença de temperatura, o compartimento onde os ovos foram colocados. Este sistema de ventilação tem permanecer aberto o tempo todo em que a máquina estiver em uso, contudo, deve-se observar se há a existência, por perto da localização da maquina incubatória de elementos em forma de pó, ou substância volátil que possam entrar no aparelho durante o processo de aeração.

Mesmo mediante a presença de um filtro, específico para evitar a entrada de microorganismos ou pó, não existe uma segurança que esta ação inesperada nunca venha acontecer. Sendo que a maior preocupação se faz com a presença de materiais voláteis, os quais passariam com maior facilidade para dentro do ambiente de incubação.

Antes de serem colocados para serem incubados, os ovos foram desinfetados, um a um, com álcool 70% embebido em algodão estéril e colocados para secar, com a câmara de ar voltada para cima, dentro do fluxo laminar, sob luz ultravioleta, por 15 minutos, como mostrado na figura 32. Durante, a limpeza dos ovos e do tempo de secagem submetida aos mesmos, este período serviu para regular a temperatura da câmara incubatória e seus anexos regulatórios.

É primordial lembrar, que a maioria dos ovos experimentais foi aberta, e que muito embora tendo suas janelas ocluídas por fita asséptica, isto não nos garante 100% a propriedade de vedação do meio interno do ovo com o meio externo do ambiente incubante.

A porta de abertura desta máquina é feita em vidro, para que possamos observar o conteúdo que esta sendo chocado internamente. É de suma importância que não sejam formadas bolhas de vapor no visor embutido na porta, o que seria um sinal de que a umidade esta muita alta dentro da incubadeira.

Se a umidade estiver muito alta, a câmara de ar do ovo se modificará, transformando-se morfológicamente, tanto no que abrange a sua localização, como no aparecimento de tamanhos atípicos, o que dificultará a inspiração da albumina que deverá ser feita depois de quatro dias nos ovos colocados para incubação.

Em alguns casos, os embriões podem perecer dentro dos ovos. A ação de bactérias sobre o embrião e a formação resultantes desta ação, como a produção de gases tal como a putrecina e compostos de enxofre, fazem a pressão dentro do ovo aumentar, a ponto do mesmo vir a se romper dentro da câmara de incubação. Raramente este processo acontece nos primeiros dias, dada a pequena massa embrionária presente no ovo. Mas a temperatura a qual o ovo é estocado antes da incubação pode gerar uma rápida decomposição do disco germinatório do mesmo, ou a contaminação exógena de agentes patogênicos, oriundos no local de postura das matrizes avícolas, local este, de onde vieram os ovos. Se por ventura, um caso de estouro de material biológico em decomposição ocorrer dentro da incubadeira, todos os ovos deverão ser sacrificados. Conseqüentemente, todo processo de assepsia protocolar, reiniciado.

A Assepsia dos Ovos, Antes da Incubação e Depois Pré Fase Experimental

Figura -32: Ovos de *Gallus Domesticus*, sendo limpos e colocados na câmara e fluxo laminar para que o procedimento protocolar experimental possa ser iniciado.

A incubação foi feita a 37,2 °C, umidade relativa (60%), mantendo os ovos calçados para que tivéssemos a certeza que não ocorreria o seu deslocamento, ou a viragem dos mesmos, durante o experimento.

Os ovos foram incubados deitados sobre a bandeja de tela, como mostrado na figura 33. Uma marca feita com grafite macio sobre a casca do ovo foi usada como referência para manter o ovo em posição estática dentro da chocadeira durante os 4 primeiros dias, identificando o ponto onde se daria o corte da casca.

Figura-33: Os ovos sendo marcados na face superior, todos ficaram nesta mesma posição até o final dos ensaios. A face marcada recebe o calor e direciona a formação da CAM, facilitando a abertura do mesmo para a observação do desenvolvimento do embrião.

Com esta estratégia, o embrião e a membrana corioalantóica posicionam-se na face voltada para cima, onde o ovo esta recebendo o calor, facilitando a observação futura.

A temperatura é apontada como um dos fatores mais importantes que afeta o desenvolvimento embrionário. Temperaturas baixas determinam atraso no desenvolvimento e altas, o aceleram. Ambas as condições, fora das variações permitidas, prejudicam as taxas de eclodibilidade.

4.7 Preparo dos ovos para os ensaios protocolares com Metil Jasmonato nas membranas corioalantóicas dos embriões de galinha (CAM).

Após 4 dias de incubação, os ovos foram levados a uma câmara de fluxo laminar e desinfetados com algodão hidrófilo banhado novamente em álcool 70 %. Para este procedimento, o ovo depois de limpo tem que ser colocado mantendo-se a posição da marca feita na casca, sobre um suporte plástico ou de papel cartonado limpo com álcool 70%, seco ao ar e mantido sob a luz ultravioleta da câmara de fluxo, antes do experimento, por cerca de 15 min.

O suporte permitiu que os mesmos fossem posicionados de maneira a não se movimentar. Os instrumentos de corte, tesouras cirúrgicas pequenas de pontas finas, e também, de pontas retas da marca DL Micof, Pinças delicadas de micro-cirurgia, de extreminidades retas e curvadas, da Marca DL Micof da Medical Equipment and Supplies Manufacturing, foram adequadamente separadas.

Seringas BD, fitas adesivas semitransparentes da marca 3 M, copos de vidros para descarte, recipientes com álcool 70% e agulhas avulsas da BD, foram colocados dentro da câmara de fluxo laminar Veco, depois de devidamente desinfetados com álcool 70%. O material de micro cirurgia a ser usado no experimento, mostrado na figura 34, foi previamente autoclavado.

Figura-34: Material de microcirurgia para abertura de ovos.

Uma agulha de bisel trifacetado foi acoplada a uma seringa de cânula siliconada BD, de 5 mL, dentro do fluxo laminar e foi introduzida através da câmara de ar do ovo situado sob fluxo asséptico, como mostrado na figura 35. A formação deste orifício tem que ser feita na divisão limitante entre a câmara de ar e as membranas internas presentes rente ao lado interno da casca do ovo.

Esta perfuração é feita lentamente, porém de forma pontual e firme, para que não ocorram trincas ou rachaduras extensas, a partir do orifício produzido, o que pode comprometer a viabilidade do ovo. A cânula da seringa não deve conter ar para que não ocorra a entrada do mesmo, possibilitando a formação bolhosa, facilmente vista na albumina. Durante a sucção tem que observar se não há resistência durante o processo de aspiração do conteúdo do ovo. Caso houver, a seringa deverá ser retirada e o processo realizado novamente, depois de algumas horas, pois houve a sucção acidental da membrana interna, que esta ligada a câmara de ar.

Figura -35: Ovo sendo perfurado na posição acima de sua câmara de ar, com uma agulha e uma seringa de 5 ml estéreis.

Durante o processo de perfuração e aspiração da albumina o ovo não pode ser movimentado para que não ocorra a ruptura da chalaza.

Durante a sucção, a ocorrência de filamentos branquiformes acompanhando a albumina retirada é o sinal evidenciado de injúria sobre a estrutura de estabilidade do vitelo em relação ao restante dos elementos encontrados dentro do ovo. Esta imobilidade deve ser obtida pela fixação ao recipiente cartonado próprio para o tamanho do ovo usado, esterilizado após banho asséptico feito com a solução de timerosal a 5%, pelo menos 2 horas antes, mantendo-o no fluxo laminar acionado para o tempo de secagem do mesmo. O procedimento está mostrado na figura 36.

Figura - 36: Remoção de 5 ml da albumina fina, por sucção cuidadosa. Ângulo aberto, mostrando as posições instrumentais devidamente preparadas para este procedimento.

Por sucção, foram removidos 5 ml de albumina, a fim de diminuir o tamanho do saco vitelino dentro do ovo. Este procedimento tem que ser feito antes do quinto dia de incubação devido a aderência das membranas junto a parte interna do ovo. Este fato é devido ao motivo do ovo ter ficado imóvel dentro da câmara incubatória,

recebendo calor somente ao lado marcado com o grafite macio, na sua parte lateral de cima.

Durante a retirada da albumina fina, a agulha se manteve firme e posicionada de maneira inclinada, aproximadamente 45 graus, para que não ocorresse, também, uma possível lesão na gema. Esta direção de introdução da agulha leva o bisel até a periferia mais externa da albumina permitindo que a albumina fina, que compõe esta porção do ovo, seja facilmente drenada. O esquema mostrado na figura 37 ilustra a posição da agulha em relação aos componentes internos do ovo.

Figura -37: Esquema do ovo tendo sua albumina retirada, para a diminuição do saco vitelino, possibilitando assim o corte da casca para a visualização da membrana corioalantóica em formação.

A albumina retirada foi a denominada com o nome comum de clara aquosa, clara fina ou albumina fina de ovo. Esta substância é mais liquefeita e encontrada na parte mais externa do conteúdo interno do ovo. A albumina succionada foi descartada dentro de um recipiente ou utilizada para estudar a solubilidade do Metil Jasmonato na mesma.

O Metil Jasmonato associado à albumina foi utilizado para testar a toxicidade do composto para os ovos, nos ensaios de viabilidade.

Após a retirada da albumina fina, com o seu conseqüente descarte ou estocagem, o orifício feito pela agulha foi lacrado com um pedaço de fita adesiva transparente asséptica como mostrado na figura 38. Existe a necessidade de observar se não ocorre um sangramento na local da perfuração. Caso haja o sangramento, pode indicar que houve o ferimento durante a introdução da agulha no embrião que deve estar sendo gerado, não comumente, perto da câmara de ar, ou mesmo deslocado para a uma das laterais do saco vitelínico.

Figura-38: Orifício feito pela agulha para a retirada da albumina sendo ocluído com a fita semitransparente e asséptica.

Com uma tesoura de ponta fina, a casca do ovo foi cuidadosamente perfurada, inicialmente na face superior, próximo da marca pré definida. Penetrando a tesoura suavemente, a casca foi recortada de maneira circular. Com a ajuda de uma pinça redonda de microcirurgia de ponta fina, DL MicoF, foi removido um pedaço de cerca de 2 cm^2 , na região marcada com o lápis, de grafite negro macio, durante a incubação, que corresponde à parte mais elevada da face sobre a qual o ovo esteve recebendo calor.

Sendo que o embrião desenvolve-se no lado onde esta voltada à fonte de calor, espera-se que a janela aberta circundando a marcação do grafite, exponha o embrião sendo formado junto da membrana corioalantóica, como mostrado na figura 39. A albumina retirada serviu como forma para a diminuição do saco embrionário,

permitindo que a tesoura no ato de cisalhamento, não ferisse o *Gallus* em formação. Durante a extração da albumina, todo saco embrionário tem seu volume diminuído deixando um espaço vazio e seguro para o corte da casca do ovo. Esta abertura se faz, criando-se uma janela para observação do embrião, no estágio de 4 dias de incubação.

Figura-39: Recorte da casca do ovo com a tesoura cirúrgica para obtenção de uma janela para observação do desenvolvimento do embrião.

Durante o processo de abertura da janela, é comum que pequenos fragmentos de casca caiam dentro do conteúdo interno do ovo, sobre a CAM. O aspecto dos fragmentos sobre a CAM está mostrado na figura 40.

Mesmo considerando que os ovos foram desinfetados na sua parte externa, estes pequenos fragmentos podem causar uma irritação, tal como o mesmo fenômeno que ocorre nos demais protocolos citados. Esta irritação, todavia pode ocasionar um falso efeito angiogênico. O processo inflamatório e ou, irritativo pode levar um aumento da vascularidade local, acionada pelo fenômeno acima citado.

Esta ocorrência é geralmente vista em ovos que possuem suas cascas frágeis e, portanto quebradiças. Para evitar perdas nestes casos, é sugerida a utilização de um pedaço da mesma fita adesiva semitransparente que será usada para ocluir a janela sobre o local que será recortado, antes que haja o corte da janela na lateral do ovo. O procedimento de cisalhamento se dará sobre a fita aderida. Esta fita proporciona maior resistência à casca durante o corte.

Figura-40: Grânulos de Casca que caíram dentro do ovo, sobre a CAM, durante a abertura do ovo.

Um procedimento de retirada de albumina, de caráter experimental, foi feito depois de 48 horas do início do processo de desenvolvimento, sem que houvesse a formação, ainda, da membrana corioalantóica do embrião de galinha, apresentando uma grande facilidade para a remoção da albumina fina do ovo, neste estágio inicial de incubação. Por outro lado, este ovo torna-se exposto com mais facilidade a

possibilidades de insucesso. A abertura do ovo nas primeiras horas de incubação abrange o período crucial para o desenvolvimento do embrião, no qual qualquer mudança de temperatura pode tornar o mesmo inviável. Mantivemos, todavia, a abertura dos ovos depois de quatro dias de incubação, com a CAM já totalmente formada. A inspeção para verificar a viabilidade do embrião, mostrada na figura 41, deve ser realizada no momento da abertura da janela.

Figura-41: Ovo sendo inspecionado, para verificação da sua viabilidade.

Confirmada a existência e a viabilidade do embrião, a janela foi lacrada com a fita adesiva transparente, como mostrada na figura 42. Os ovos assim lacrados retornaram para a incubadeira onde permaneceram deitados, na mesma posição inicial em que foram inicialmente colocados e a incubação foi continuada por mais

quatro dias, inspecionando-se diariamente o desenvolvimento e a viabilidade do embrião.

Figura-42: O Ovo sendo fechado para retornar a incubadeira por uma fita transparente e asséptica.

Todo este processo deve ser feito dentro do fluxo laminar para que não haja contato com o ambiente externo. O ovo, depois de aberto, também não deve ser movido para nenhum lado, para evitar o deslocamento do embrião e da CAM.

Ao final desse período, completado o 7^º dia de incubação, o ovo foi retirado da incubadeira e a casca foi desinfetada com álcool, com cuidado para não contaminar o interior do ovo. Por sugestão de alguns autores, o álcool 70% que será usado para re-fazer a assepsia, tem que estar ligeiramente aquecido, para que não ocorra um possível choque térmico no mesmo, durante a assepsia. Contudo, fizemos com o mesmo em temperatura ambiente, onde não observamos nenhuma

intercorrência. O embrião é facilmente observado através da fica transparente, como pode ser verificado na figura 43.

Figura -43: Ovo dentro da incubadeira completando 7^º dia do início da incubação.

Um protocolo bastante utilizado preconiza que seja colocado um pequeno disco de papel filtro sobre a CAM, com auxílio de uma pinça estéril, o qual servirá como suporte das substâncias a serem testadas quanto aos efeitos de angiogênese e antiangiogênese. Nos primeiros ensaios realizados, um disco de papel filtro com 0,5 cm de diâmetro foi colocado sobre a CAM, alinhado com os olhos do embrião, e serviu como local para a aplicação do Metil Jasmonato, em solução aquosa, no sétimo dia de incubação, como mostrado na figura 44.

A PGE_2 foi utilizada como um controle do efeito pró-angiogênico. As concentrações de Metil Jasmonato empregadas neste ensaio variaram entre 1 μ M e 1M. A PGE_2 foi empregada em soluções 1 μ M e 1mM.

Figura -44: Modelo padronizado por diversos autores, para testes de drogas e a avaliação de seus efeitos *in vivo*, com a colocação de papel filtro sobre a CAM.

Após mais quatro dias, ou seja, durante o 12º dia de incubação, a coleta do material ocorreu após o sacrifício do embrião, por hipotermia e fixação *in situ*, por 20 min, com formalina gotejada sobre a CAM.

As membranas foram colhidas, recortando-se uma região circular ao redor do local em que repousavam os papéis filtro. Cada peça de CAM foi lavada com solução salina gelada e observada em uma lupa entre lâmina e lamínula. Fotos digitalizadas foram obtidas em resolução de 800 x 600 pixels para análise.

Sendo a CAM composta de uma delicada camada epitelial é inevitável que ocorra algum grau de irritação associada à presença do suporte de papel. Os aspectos da membrana *in situ* e após a coleta estão mostrados na figura 45.

Figura -45: Aspecto da CAM no ovo e após a coleta. Um processo de irritação secundária pode ocorrer devido ao uso de papel filtro sobre a membrana corioalantóica do ovo de galinha em desenvolvimento.

4.8 Modelos de angiogênese modificado, em membrana corioalantóica de embrião de galinha, observando o efeito do Metil Jasmonato, em água e nanocarreadores.

O modelo foi refinado para este trabalho, o filtro foi abolido e as soluções do Metil Jasmonato em água, na nanomolécula A-14, ou nas suspensões de lipossomos contendo o Metil Jasmonato foram aplicadas diretamente sobre a CAM. Esta modificação foi uma estratégia para ampliar a sensibilidade da técnica a efeitos sistêmicos e evitar o processo inflamatório secundário à irritação local pelo contato da CAM com o papel.

Além disso, a digitalização da textura do papel sob a CAM dificulta a análise das imagens obtidas. Embora possa ocorrer espontaneamente durante a lavagem da CAM, a remoção do papel previamente à observação não é um procedimento livre de artefatos, sendo desaconselhável aplicar qualquer procedimento para destacá-lo do sítio onde se encontrar firmemente aderido. Com a modificação da técnica de aplicação, a região anatômica de observação pode ser padronizada e evitou-se a sombra do papel no fundo da imagem. A manipulação foi mais trabalhosa, mas a análise das membranas foi mais fácil nos ensaios sem o suporte de papel, porque a qualidade das imagens foi bastante superior.

Neste novo protocolo, as amostras foram depositadas diretamente sobre a membrana corioalantóica do ovo na posição direcional da cabeça do embrião, em um volume igual ou inferior a 100 μ L, no sítio indicado na figura 46.

As concentrações utilizadas consideraram o volume total do ovo para a distribuição, de 60 mL.

Figura-46: Local onde foi escolhido para que o Metil Jasmonato fosse aplicado, sem que houvesse o processo inflamatório secundário.

A cronologia dos ensaios foi mantida, com a abertura dos ovos no 4º dia de incubação, aplicação dos compostos testados durante 7º/8º dia de desenvolvimento e a coleta no 11º/12º dia de vida do embrião. Cada amostra foi preparada em triplicata. Foi estabelecido um limite de 24 ovos por ensaio para que a observação da morfologia dos vasos e a coleta das imagens das CAMs pudessem ser realizadas sempre por um mesmo observador e num intervalo de tempo adequado para a preservação das amostras, cuja fixação é de limitação frágil. Artefatos devidos à perda estrutural das amostras não permitem a análise posterior a 8 horas.

Os ovos, após a aplicação do Metil Jasmonato puro ou nanocarreado e seus respectivos controles de veículo, foram igualmente fechados com uma fita adesiva semitransparente, como mostrada na figura 47. Todo cuidado foi mantido para que não houvesse contaminação. Nos ensaios com o composto carreado, a faixa de concentrações testada considerou a toxicidade do veículo e a comparação com o efeito do composto puro. As medidas com os nanocarreadores indicam a dose de Metil Jasmonato inclusa na preparação. Nos controles respectivos, foram preparadas as quantidades equivalentes do veículo, caso a caso.

Figura-47: Aberta uma janela de observação em sua face lateral superior, a mesma a qual recebeu o calor da chocadeira, posteriormente, observando a viabilidade do embrião, o mesmo ovo é fechado com uma fita transparente, estéril.

No protocolo modificado, a CAM foi lavada e dissecada com o material microcirúrgico sobre placas de Petri, após a ligadura dos vasos mais calibrosos do

embrião. Os vasos mais calibrosos foram ligados sob técnica cirúrgica em microvasos, em sua porção mais proximal, cerca de 3 a 5 mm da pele do embrião.

A passagem e a ligadura foram realizadas com fio cirúrgico de algodão 3-0 em triplo nó, como indica a figura 48. Este cuidado aumentou a sensibilidade da técnica de coleta das imagens, por evitar a perda do sangue contido nos vasos. O contraste entre os vasos repletos de sangue e a membrana distendida sobre a lâmina é importante para a observação da rede vascular, que é feita no material mantido a fresco, sem coloração.

Figura-48: Embrião em análise, com o nó triplo dado para que o conteúdo sanguíneo se mantenha dentro dos vasos para possível análise.

Após a dissecação, a diátese e o embrião foram separados da CAM. A porção da membrana que compõe a gema foi cuidadosamente divulsionada com material microcirúrgico e um fluxo de água destilada gelada.

A sua base vascular também foi ligada com fio de algodão 3-0, em duplo nó na sua porção mais proximal, antes da montagem, padronizada para representar a porção distal da ramificação do vaso mais calibroso. Esta porção foi distendida delicadamente e com auxílio de um pouco de solução salina isosmótica gelada, sobre uma lâmina de microscopia, evitando-se a presença de dobras e bolhas de ar. A lâmina, com a membrana distendida, foi então recoberta com uma lamínula, mantendo-se um mínimo de líquido na preparação, para homogeneizar a espessura do material, diminuir a sombra de resíduos de proteína e lipídios e evitar a opacificação e a interferência de bolhas de ar durante a captura digital. Excesso de líquido nesta fase pode levar a perda de conteúdo dos vasos. O resultado apresenta-se como mostrado na figura 49.

Figura – 49: CAM, em lâmina mantida entre lamínulas para não perder a umidade e uniformizar a espessura do material para coleta das imagens.

A lâmina foi fotografada em lupa estereoscópica ou microscópio ótico em aumento 2x. Para a análise comparativa dos efeitos sobre a angiogênese, foram utilizadas imagens capturadas com o programa ACT-2U por uma Câmera digital DS-U1 Nikon ligada a uma lupa estereoscópica Nikon SMZ1800 em aumento 2 x sob iluminação padrão, equipamento mostrado na figura 50. As imagens foram gravadas em arquivos de imagem TIFF, em alta definição (1280x 960) e analisadas como tal ou após transformação em imagem binária (preto e branco).

Figura-50: Lupa estereoscópica Nikon SMZ1800.

As imagens coletadas foram processadas e analisadas manualmente com o auxílio do programa ImageJ. Este trabalho foi realizado pelo matemático Lucas Vicente da Silva, sem que o mesmo fosse informado previamente sobre o tratamento realizado nas amostras individuais fotografadas. O problema apresentado a ele foi o de obter a máscara, em preto e branco, das redes vasculares representadas em cada imagem. Para isto, ele desenvolveu um procedimento padronizado, cujo objetivo foi obter uma boa sensibilidade para as estruturas mais delgadas da rede vascular, excluindo da melhor maneira a sombra do campo e estruturas como dobras e bolhas da representação final.

Inicialmente, a imagem colorida foi decomposta em três novas imagens, correspondentes aos valores de suas componentes de cor no sistema RGB. Selecionou-se apenas a imagem correspondente ao tom azul, que tem um bom contraste com o plano de fundo da imagem. Resultados equivalentes foram obtidos com a imagem correspondente ao tom verde ou com a média entre as duas componentes, para todas as fotos coletadas. Depois, os valores de cada pixel da imagem original foram divididos pelos valores dos pixels correspondentes da imagem da lâmina limpa, coletada no mesmo dia e nas mesmas condições de iluminação, aumento e contraste e trabalhada da mesma maneira. Este procedimento, com o resultado em imagem de 32 bit, permitiu a normalização das imagens, e corrigiu o efeito do gradiente de luz e sombra, inerente ao equipamento de observação e à forma de coleta das imagens. Por fim, a imagem resultante, em tons de cinza, foi convertida numa imagem binária em que os vasos aparecem em preto e o fundo em branco. O programa depende de um limiar de corte para discriminar quais tons de cinza serão considerados como preto ou como branco.

Este limiar foi fixado uma única vez e utilizado para todas as imagens trabalhadas em um mesmo ensaio. O cálculo da “área de vasos” considerou a quantidade de pixels pretos, sempre normalizados em relação às dimensões e à resolução da imagem.

4.9 Adaptação do modelo de angiogênese modificado, em membrana corioalantóica de embrião de galinha, para estudo do efeito do Metil Jasmonato na presença de tumores.

O modelo de angiogênese foi adaptado para incluir o crescimento das células de melanoma murino B16-F10 sobre a CAM.

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 mL, em meio RPMI contendo soro fetal bovino 10%. As suspensões celulares, para uso, foram preparadas após tripsinação das garrafas de cultura, coleta das células em PBS estéril, centrifugação e lavagem da suspensão com PBS, ajustando-se a concentração celular para que o volume de semeadura sobre os ovos não ultrapassasse 50 μ L. As contagens celulares, realizadas no máximo 20 minutos antes da semeadura, foram feitas manualmente em câmara de Neubauer em solução isosmótica de Azul de Tripan. Colocadas em microtubos estéreis de polipropileno Ependorf, as células foram trazidas para a câmara de fluxo laminar, em um recipiente com gelo.

Os ovos foram retirados da incubadeira, 4^º dia de incubação e todo o processo de assepsia, retirada de albumina fina, abertura da janela na lateral dos ovos, operacionados como nos modelos acima descritos.

Observou-se a viabilidade do embrião gerado, dando ênfase à formação da membrana embrionária, sua morfologia e aspecto límpido.

As células foram semeadas por toda extensão da CAM, utilizando técnica e material estéril. A quantidade de células usadas neste ensaio foi de 1 a $2,5 \times 10^4$ células por ovo.

Durante o processo de semeadura, a ponteira da pipeta foi usada como ferramenta inoculatória. Este procedimento pode ser feito, também, com a ajuda de uma seringa acoplada com uma agulha estéril, para dar maior firmeza ao delicado procedimento. Pequenos movimentos mecânicos permitiram ferimentos leves na membrana corioalantóica, e as células neoplásicas foram depositadas lentamente entre as partes que compõem a serosa primitiva embrionária.

O processo delicado muitas vezes desencadeia um foco hemorrágico de baixa intensidade. Caso a hemorragia seja de grande intensidade, o embrião pode perecer perdendo-se o ensaio.

Em caso de sangramentos leves, a ponteira foi trocada e a semeadura recomeçada, com a escolha de outro local para início dos microtraumas.

Os ovos foram novamente fechados com fita adesiva semitransparente asséptica, e retornados a incubadeira.

O tempo para a realização para este experimento deverá ser o mais breve possível, uma vez que no 4^º dia de incubação e do desenvolvimento do Gallus, o mesmo ainda não produz seu próprio calor, necessitando de fonte exógena de energia de aquecimento, para que ocorra seu desenvolvimento.

Os ovos foram acompanhados por 72 horas após a manipulação, para observar se houve a morte do embrião. Verificada a viabilidade dos embriões, deu-se o início ao processo de tratamento dos ovos semeados com as células neoplásicas. No 7º dia após o início da incubação, os ovos foram novamente conduzidos para a câmara de fluxo laminar, depois de sofrerem o processo de assepsia novamente.

Em ambiente estéril, as fitas adesivas foram retiradas com a ajuda de uma pinça cirúrgica dente de rato, e foram removidas lentamente, no sentido da bolsa de ar para a parte mais pontiaguda do ovo. A fita removida foi descartada, no recipiente específico para este procedimento, situado dentro do ambiente de trabalho estéril.

O Metil Jasmonato foi aplicado em toda a extensão da CAM, com a ajuda de uma pipeta, cuja ponteira fazia a aplicação em espalhamento.

Após a aplicação, os ovos tiveram suas janelas novamente fechadas, com fita adesiva semitransparente estéril. Levados novamente para dentro da incubadeira, onde eles permaneceram em incubação até o 14º dia do início de desenvolvimento do embrião. Existe a potencialidade da formação de bolhas de vapores, formadas na fita adesiva que esta ocluindo a janela aberta para a observação dos embriões. Se as bolhas persistirem, por mais de 24 horas, o ovo deverá ser retirado novamente e feito todo processo de limpeza, assepsia do mesmo, para a troca de fita adesiva semitranslúcida e estéril, dentro do fluxo laminar.

Os ovos foram retirados da incubadeira, levados ao sacrifício por hipotermia, e o processo de observação da membrana corioalantóica do embrião de galinha, foi feita da maneira descrita nos modelos acima.

Durante o processo de incubação final, os ovos devem ser observados a cada 12 horas, uma vez que o processo de colonização pelas células B16-F10, faz com

que a membrana embrionária sofra mudanças morfológicas, dentre as quais mudança de cor, tornando-a de cor levemente esbranquiçada e opaca. É neste período que as mortes dos embriões dos ovos, se potencializam. Para a verificação da viabilidade dos embriões, os ovos deverão ser retirados da incubadeira e passados diariamente por perícia ovoscópica. Os ovos controles foram submetidos ao mesmo processo da forma descrita aos demais ovos do modelo.

O tratamento feito com Metil Jasmonato foi feito, na sua forma pura e nanocarreado com lipossomos e com A-14. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. As doses usadas foram equivalentes às doses usadas na curva de crescimento, para a observação da compatibilidade do modelo *in vivo* e *in vitro*

4.10 Estudos de sobrevida utilizando a albumina do ovo como veículo para o Metil Jasmonato

Um procedimento experimental específico foi desenhado para estudar a resistência do ovo embrionado à exposição ao MeJa e verificar a possibilidade de utilizar sítios anatômicos distintos para a inoculação das células neoplásicas e para o tratamento. Dois resultados preliminares foram importantes para este desenho: a dissolução do Metil Jasmonato na albumina do ovo sem que ocorresse a separação de fases na solução, comprovada pelas medidas da concentração e do espectro composto no CG-MS e o fato de que o composto pode ser completamente removido desta solução por uma diálise simples contra água (1:100 v/v).

Assumiu-se, como aproximação, que o MeJa distribuir-se-ia de forma homogênea por todo o volume do ovo, para o cálculo das concentrações do composto. A albumina foi retirada como para o procedimento usual de estudo de angiogênese, de forma estéril, mas foi mantida em tubos de próprios, falcon, estéreis, identificados segundo a sua correspondência com os ovos incubados. Um volume de 6 mL foi utilizado, onde no processo de reintrodução da albumina, 1 mL será desprezado. O esquema do procedimento está ilustrado na figura 51.

Figura-51: Ilustração da retirada da Albumina Fina, para ser utilizada nos estudos de viabilidade do embrião, frente a substância.

Estes tubos foram utilizados para o preparo de soluções estéreis de MeJa a serem reinoculadas no próprio ovo, em quantidades ilustradas na figura 52.

Albumina Fina Sendo Guardada Para a Fase de Retroalimentação Experimental.

Figura-52: Tubos coniformes de polipropilenos – Falcons, com albuminas fina retirada dos ovos sob técnica estéril.

A retirada de albumina fina foi feita nos procedimentos análogos aos já citados. A Albumina mais liquefeita, fina, seria mais fácil de ser reintroduzida dentro do ovo, com menores chances de traumatizar ou inviabilizar o embrião já em desenvolvimento. Nas fases iniciais, a rede vascular primitiva se rompe com facilidade, até mesmo com movimentos mecânicos bruscos e fortes. Outro fator favorável ao uso da albumina fina é a possibilidade de melhor diluição do Metil Jasmonato dentro da mesma. Contudo, somente para consignação neste trabalho, a albumina grossa, também, permitiu a tal diluição da mesma forma.

Os ovos usados neste ensaio tiveram a sua incubação feita até 4^º dia de desenvolvimento embrionário idêntica aos demais. Os ovos que iriam receber as células B16-F10, sofreram o corte em suas laterais para a formação das janelas de observações dos embriões. Da mesma maneira anterior, como já detalhada, os ovos foram semeados com as células neoplásicas na quantidade protocolar de 2×10^4 células, e tiveram suas janelas vedadas com fita adesiva asséptica. Os demais ovos mantiveram-se com suas cascas intactas, somente com a albumina retirada. O esquema do embrião viável, com a redução do volume de albumina está ilustrado na figura 53.

Figura-53: Esquema do ovo aberto, quando viabilidade do embrião encontra-se positiva, para ser semeado com as células do melanoma murino B16-F10. A redução do volume do ovo foi promovida também nos ovos destinados ao estudo de viabilidade e para que pudessem ser semeadas as células neoplásicas.

Os ovos foram levados de volta a máquina de incubação, onde se mantiveram imóvel, como configurado nas descrições dos modelos anteriores.

As albuminas retiradas, tanto dos ovos sem janelas de observações, como os ovos que tiveram suas janelas cortadas, foram mantidas.

Os tubos foram incubados fechados, na mesma temperatura que os ovos. Ao final do 7^º dia de incubação, os tubos contendo albuminas colhidas no 4^º dia foram observados para a ocorrência de sedimentos ou aspecto turvo, que poderia indicar contaminação. Caso isto ocorresse, a amostra seria descartada. Os tubos que permaneceram límpidos, como os mostrados na figura 54, foram utilizados para o procedimento.

Figura-54: Amostra das albuminas reservadas para os ensaios de adição de Metil Jasmonato carregado pela clara fina.

Também foram inspecionados os ovos para a ocorrência de morte embrionária. Estas amostras foram descartadas. Como citado anteriormente, outro fator de grande importância é fazer um exame do ovo por transluminescência, denominado “ovoscopia”. Consiste em aproximar o ovo de uma fonte de luz forte, direcionado sobre a casca do mesmo. O efeito da projeção da luz revela a existência, ou não, de um embrião em crescimento dentro do ovo.

Este procedimento, mostrado na figura 55, tem se tornado comum, em grandes produções de aves, para evitar que um ovo improdutivo, seja ele por estar infértil ou por estar com morte embrionária, ocupar o lugar de outro ovo que poderia estar eclodindo.

Figura-55: Transluminescência dos ovos para a verificação de viabilidade embrionária. Fonte animalscience.ucdavis.edu

Contudo, este procedimento somente poderá ser feito em ovos de cores claras que permitam a transluminescência, possibilitando de ver as sombras do embrião sendo ou não, formado.

Existem milhares de aves e com diferentes ovos, tanto no que diz respeito as formas como também as cores destes ovos.

Como exemplos existem ovos de cores quase negras. Figura 56, que impedem este fenômeno de observação e constatação da viabilidade do embrião, durante a sua evolução.

Figura-56: Amostragem de ovos de diferentes cores, ilustrando fatores que dificultam a observação da viabilidade do embrião durante a ovoscopia. Fonte: Fundação Nacional do Meio Ambiente “Dr Ernesto Pereira Lopes” - FUNAMA

Muitas mortes do embrião podem ocorrer de forma prematura. Uma das causas mais aceitas no meio de produtores avícolas é a contaminação exógena do ovo.

O aspecto relacionado à morte prematura do embrião que tem o seu início de desenvolvimento, contudo, parece precocemente é a formação de um círculo hematogênico sobre a gema, como mostrada na figura 57.

O procedimento de ovoscopia deve ser efetuado antes da retro-alimentação da albumina para evitar que um ovo inviável se rompa dentro do fluxo laminar, colocando todo processo experimental em risco.

Outro meio de verificação, contudo, não muito seguro é observar se houve fechamento por inteiro do orifício por onde foi retirada a albumina. Geralmente os ovos que perecem apresentam refluxo por este canal, decorrente da liquefação do conteúdo interno do ovo, já em estado de decomposição. Uma vez feito este procedimento, a segunda etapa do protótipo do ensaio deve ser continuada.

Figura-57: Morte embrionária no início do período de desenvolvimento do embrião.

Muitas destas contaminações exógenas acontecem no local onde o ovo foi produzido. Geralmente durante a fase de postura, os ovos são colocados sobre camas avícolas, compostas por extratos vegetais, tais como palha de arroz ou palha de casca de amendoim. Estas forragens tornam-se facilmente um meio de cultura para fungos e bactérias que não acometem as galinhas poedeiras, mas podem acometer os embriões dentro dos ovos. Estes mesmos fungos podem penetrar pela casca íntegra dos ovos, quando os mesmos apresentarem uma alta patogenicidade, ou por pequenas rachaduras, trincas, que descontinuem a casca do ovo.

Deformidades ou possíveis contaminações podem ser debeladas quando houver uma assepsia cuidadosa no ovo e dentro da incubadeira, salvo as infestações que ocorrem no leito de postura ou pais contaminados, levando a morte do embrião, que poderá ser constatada pelo procedimento de ovoscopia.

As soluções de MeJa puro foram preparadas com cada albumina reservada e reintroduzidas nos seus respectivos ovos, no 8º dia de início de incubação. Este procedimento foi feito com cuidado para evitar contaminação dos ovos durante o manuseio. Assim, foi precedido pela assepsia com álcool 70%, e pela remoção cuidadosa da fita que obstruía o orifício utilizado antes para a retirada da albumina.

O preparo das soluções está mostrado na figura 58. A figura 59 mostra o esquema da incubação do ovo com as células previamente semeadas e anteriores à reintrodução da albumina.

A injeção foi feita com uma agulha estéril e ligeiramente mais fina que a utilizada para a retirada da albumina, pelo mesmo orifício utilizado anteriormente, utilizando-se a distância de 1,5 cm e pequena inclinação, como adequadas para localização do sítio de injeção. A reintrodução do volume de 5 mL foi lenta, para evitar a formação de bolhas e o extravasamento do conteúdo do ovo.

Figura-58: O Metil Jasmonato sendo preparado adicionado nas albuminas para ser reintroduzido nos ovos.

Figura-59: Ilustração do ovo semeado com as células neoplásicas, no 4º dia de desenvolvimento embrionário, com janela e a reintrodução da albumina e sendo novamente ocluído e ficando incubado até o 17º dia de incubação. E o ovo, sem semeadura de células tumorais, recebendo a albumina pura.

Nos ovos sem semeadura das células B16-F10, em que a janela lateral não foi aberta, Figura 59, a aplicação foi feita lentamente e com o cuidado adicional de evitar a formação de pressão interna exacerbada o que colocaria em risco de ruptura da casca e perda do ensaio. Já na reintrodução da albumina nos ovos cultivados com células neoplásicas, os adesivos de oclusões foram removidos, permitindo assim, a equiparação de pressão entre o meio interno do ovo e do meio externo, como ilustra a figura 60.

Figura -60: Re-introdução de albumina nos ovos.

O risco de sangramento foi considerado e testado pela aspiração cuidadosa de um pequeno volume de albumina, antes do início e pela observação dos ovos ao final do procedimento. Finalizada a administração, o orifício utilizado foi novamente ocluído e o ovo foi mantido inclinado, por 15 min, com a câmara de ar voltada para cima.

Depois deste período, ovos foram novamente colocados dentro da incubadeira e observados a cada 24h para verificar a ocorrência da morte embrionária. Os ovos foram cultivados até o 17º dia de incubação e sacrificados por hipotermia. A observação de viabilidade foi reunida e descrita em gráficos do número de sobreviventes por dia, durante o período analisado.

5 Resultados

Análise de Metil Jasmonato: A solução de Metil Jasmonato em etanol produziu um pico principal em 8,15 min, e um pico menor, em 8,4 min, como mostrado na figura 61. Estes picos correspondem à proporção isotópica do composto comercial, 96% cis-trans. O espectro de massa do composto, correspondente ao pico principal está mostrado na figura 62.

Figura-61: Cromatograma do Metil Jasmonato. Injeção automática no modo splitless, temperatura de 250°C volume de 1 µL de uma solução de Metil Jasmonato em etanol, sob fluxo de Hélio de 0.6ml/min. Rampa cromatográfica: início a 100°C por 1 min, inclinação de 10°C/minuto até 300°C, patamar de 300 °C, mantido por 4 minutos, tempo total de 24,5min.

Figura-62: Espectro de massa do pico principal do cromatograma do Metil Jasmonato em solução etanólica, como mostrado na figura 1 no tempo de retenção de 8 min e 15 s. Transferência do cromatógrafo para o detector a 250°C e detecção a 200°C, modo de varredura m/z: 50-400.

Os principais sítios de clivagem e os fragmentos encontrados coincidem com os relatados por outros autores e estão mostrados a seguir na figura 63 e na tabela 1:

Figura-63: Principais sítios de fragmentação do Metil Jasmonato.

Tabela 1- Fragmentos observados durante a análise do Metil Jasmonato em solução etanólica.

227,05	22	$C_{13} H_{20} O_3$ Metil Jasmonato
209,07	4	$C_{13} H_{21} O_2$ (- OH)
194,07	10	$C_{12} H_{17} O_2$ (- C H ₃ O)
165,07	4	$C_{11} H_{16} O$ (- C ₂ H ₃ O ₂)
156,00	13	$C_8 H_{11} O_3$ (- C ₅ H ₉)
153,12	28	$C_{10} H_{14} O$ (- C ₃ H ₅ O ₂)
135,14	6	$C_{10} H_{15}$ (- C ₃ H ₅ O ₂ e OH)
109,09	5	$C_7 H_8 O$ (- C ₅ H ₉ e C H ₃ O ₂)
97,07	19	$C_6 H_8 O$ (- C ₅ H ₉ e C ₂ H ₃ O ₂)
		Metilciclopentanona
83,05	100	Ciclopentanona
82,04	18	Ciclopentanona
55,05	12	$C_2 H_3 O$

A análise mostrou-se adequada para a determinação do composto em solução aquosa, com reprodutibilidade e recuperação próximas de 100% (n=3). A recuperação do composto incorporado em carreador lipídico, após a diálise correspondeu a 93±5 % de incorporação para os lipossomos (n=3). O composto foi completamente removido de uma solução 315 µg/mL preparada com MeJa em albumina de ovo por diálise de 5mL contra 200mL de PBS. O tempo de retenção e o espectro de massa do pico principal coincidiram, em todas as análises, com os mostrados nas figuras 61 e 62.

5.1 Efeitos do Metil Jasmonato in vitro sobre o crescimento celular:

O MeJa mostrou-se tóxico para as HUVECs em concentrações iguais ou maiores do que 1mM. O Metil Jasmonato mostrou-se tóxico para as células de melanoma murino B16 -F10 nas mesmas concentrações. Para ambos os tipos celulares, concentrações entre 100 nM e 100 μ M não inibiram o crescimento. Os resultados estão mostrados nos gráficos 1 e 2. .

A citotoxicidade foi observada também pelo efeito do composto sobre a redução do MTT em 24h de exposição. Este efeito mostrou-se dependente da densidade de plaqueamento das HUVECs. Nas concentrações iguais ou menores do que 1mM, o Metil Jasmonato não interferiu com a redução do MTT quando a densidade de plaqueamento das HUVECs foi de 2×10^5 células/mL (gráfico 1). Entretanto, aumentou a redução do MTT em culturas celulares plaqueadas em densidades menores, de 1×10^4 células/mL (gráfico 3).

Gráfico-1: Efeito do Metil Jasmonato sobre o crescimento das células endoteliais (HUVEC, 2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços, na presença de diluições seriadas de Metil Jasmonato. Eixo principal, símbolos vazados: citotoxicidade medida pela redução do MTT. Cada ponto corresponde à média de quatro leituras efetuadas em duplicatas independentes, exceto para o controle, medido em quadruplicata. O valor medido para os controles não expostos está mostrado pela barra de erro correspondente, sobre o gráfico. Eixo secundário, símbolos cheios: tempo de dobramento calculado a partir das culturas celulares. Cada ponto corresponde a média de três ensaios independentes.

9

Gráfico-2: Efeito do Metil Jasmonato sobre o crescimento das células de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços, na presença de diluições seriadas de Metil Jasmonato. Eixo principal, símbolos vazados: citotoxicidade medida pela redução do MTT. Cada ponto corresponde à média de quatro leituras efetuadas em duplicatas independentes, exceto para o controle, medido em quadruplicata. O valor medido para os controles não expostos está mostrado pela barra de erro correspondente, sobre o gráfico. Eixo secundário, símbolos cheios: tempo de dobramento calculado a partir das culturas celulares. Cada ponto corresponde a média de três ensaios independentes.

Gráfico-3: Efeito do Metil Jasmonato sobre a viabilidade em 24h das células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço), medida pelo ensaio de redução do MTT em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de oito leituras efetuadas em quatro ensaios independentes, a linha contínua representa a medida dos controles não expostos, para comparação.

A concentração em que se verificou o efeito citotóxico também variou com a formulação do MeJa em carreadores. A formulação em lipossomos foi bem tolerada pelas HUVECs e a citotoxicidade ocorreu em concentrações muito próximas, e nunca inferiores às observadas com o composto puro. Em lipossomos, as HUVECs mantiveram alguma proliferação em concentrações da ordem de 4 mM. As HUVECs e as células de melanoma exibiram comportamento semelhante quanto à citotoxicidade da formulação em lipossomos, como mostrado nos gráficos 4 a 9.

Gráficos 4 e 5 – Comparação entre o efeito do Metil Jasmonato puro ou carreado em lipossomos de fosfatidilcolina de ovo sobre o crescimento de células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço), ou de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço) em cultura em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de três leituras efetuadas em duplicatas independentes.

Gráficos 6,7,8 e 9: Comparação entre a citotoxicidade Metil Jasmonato puro e carregado em lipossomos de fosfatidilcolina de ovo para células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço) e de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço). Medidas de redução do MTT após 24 h de exposição, em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de quatro leituras independentes.

O nanocarreador polimérico do A-14 não foi bem tolerado pelas células em concentrações equivalentes a $10 \mu\text{M}$ de MeJa carregado. Neste tipo de formulação, as HUVECs e as células de melanoma proliferaram bem em presença do veículo equivalente à dose de $1 \mu\text{M}$ de MeJa, mas não em concentrações mais altas.

A citotoxicidade do composto carregado ocorreu em concentrações inferiores por uma ordem de grandeza, ambas as células foram incapazes de proliferar na presença de 0,1 μ M de MeJa no A-14.

As HUVECs e as células de melanoma exibiram comportamento semelhante quanto à citotoxicidade da formulação, com alterações no teste do MTT, indicando algum tipo de lesão reversível ou adaptação a estas concentrações no período de 24h. Os resultados estão mostrados nos gráficos 10 a 13.

Gráficos 10,11,12 e 13 – Comparação entre o efeito do Metil Jasmonato puro ou carreado no nano carreador polimérico A14 sobre o crescimento de células endoteliais (HUVEC, 1×10^4 células/poço), ou de melanoma murino (B16 -F10, 1×10^4 células/poço) em cultura em placas de 96 poços. Cada ponto corresponde à média de três leituras efetuadas em duplicatas independentes.

A adição de Metil Jasmonato às culturas celulares produziu alterações morfológicas sugestivas de toxicidade: figuras de apoptose, multinucleação, vacuolização, anisocariose, condensação da cromatina, espessamento da membrana nuclear, cariorrexis. Imagens típicas desses efeitos estão mostradas na figura 64.

Figura-64: Aspectos morfológicos dos efeitos tóxicos do Metil Jasmonato sobre as células endoteliais (HUVEC) e de melanoma murino (B16 -F10) em cultura de 60h.

Os efeitos do Metil Jasmonato sobre o ciclo celular foram estudados após 18h de exposição. Neste tempo, a marcação com Iodeto de Propídio revelou um padrão sugestivo de indução de apoptose nas concentrações de MeJa 10mM, enquanto que em 1 mM, revelou-se uma proporção modificada entre as populações, típica de bloqueio na transição G1/S. A exposição a concentrações mais baixas de Metil

Jasmonato não mostrou efeitos sobre o ciclo celular, neste tempo, como mostrado na figura 65.

Figura-65: Efeitos do Metil Jasmonato sobre o ciclo celular das células endoteliais (HUVEC) em cultura de 18h.

As mesmas doses e tempos de exposição revelaram uma variação na porcentagem de marcação com Laranja de Acridina, que revela os compartimentos ácidos intracelulares. Esta marcação foi utilizada como um indicador da ocorrência de Autofagia. Os resultados estão mostrados na Tabela 2. Da mesma maneira, constam da Tabela 2 os resultados da determinação de VEGF. As concentrações de VEGF diminuiram na presença de Metil Jasmonato 10 μ M, mas não em 1mM de Metil Jasmonato.

Tabela 2 – Efeitos do Metil Jasmonato sobre o Ciclo celular e a produção de VEGF em HUVECs

Metil Jasmonato, condição de tratamento	Distribuição segundo as fases do ciclo celular, % (18h)			Marcação com Laranja de Acridina, % (18h)	VEGF, pg/mL (2.10 ⁶ células, 4h)
	Células mortas	G0/G1	G2/S		
Não tratadas	6	59	35	6,3 ± 0,1%	431 ± 67
10mM	93	5	2	n.d.	n.d.
1mM	13	72	15	6,2 ± 0,1%	566 ± 31
100µM	8	56	36	6,7 ± 0,3%	450 ± 30
10µM	7	60	33	9,0 ± 0,5%	319 ± 12

5.2 Efeitos do Metil Jasmonato no modelo de angiogênese in vivo

Toxicidade do MeJa para o ovo embrionado

A toxicidade do MeJa, reintroduzido nos ovos na própria albumina em concentrações iguais ou maiores do que 0,37mM está mostrada no gráfico 14 . A adição do MeJa diretamente sobre a CAM, adotada nos ensaios de angiogênese, mostrou toxicidade equivalente.

Gráfico-14 Toxicidade do Metil Jasmonato in vivo, estudo de sobrevivência. Os ovos embrionados foram expostos ao Metil Jasmonato nas doses de 100, 50, 10 e 5 μ l por ovo ($n=5$), em um volume de 5mL de albumina retirada do próprio ovo. Os controles foram expostos ao veículo, sem o MeJa. As concentrações indicadas na legenda foram calculadas assumindo-se o volume de 60 mL/ovo.

Gráfico-15: Toxicidade do Metil Jasmonato in vivo, estudo de sobrevivência. Os ovos embrionados foram expostos ao Metil Jasmonato nas doses de 100, 50, 10 e 5 μ l por ovo ($n=5$), em um volume de 5mL de albumina retirada do próprio ovo. Os controles foram expostos ao veículo, sem o MeJa. As concentrações indicadas na legenda foram calculadas assumindo-se o volume de 60 mL/ovo.

5.3 Efeitos do Metil Jasmonato sobre a angiogênese

A aplicação de Metil Jasmonato sobre a CAM baseado no protocolo onde é inserido um filtro circular para dar suporte a droga testada foi feita com o auxílio de discos de papel e resultou em figuras que sugerem o efeito antiangiogênico do MeJa em concentrações iguais ou maiores do que 1mM. Os resultados estão mostrados na figura 66. O efeito de PGE_2 está mostrado para comparação. Ao contrário do Metil Jasmonato, a PGE_2 mostrou evidente proliferação de vasos quando aplicada em concentração 1 mM no disco sobre a CAM. Os resultados estão mostrados na figura 66. A figura 67 mostra as imagens binárias de dois discos, obtida a partir de amostras independentes de CAMs controle, como as mostradas na figura 66

Figura -66: Efeito de Metil Jasmonato sobre a angiogênese in vivo, comparação com os efeitos de PGE_2 . As concentrações de cada composto, aplicadas sobre os discos de papel de filtro em um volume de $10\mu\text{L}$, estão indicadas sobre as figuras. Microscopias de campo claro das membranas recortadas ao redor do papel e distendidas sobre lâminas de microscopia, sem coloração, aumentam de 2x.

Figura -67: Imagem binária produzida a partir amostras controle. como as mostradas na figura 66. Digitalização com o programa Image J.

A mudança do protocolo de angiogênese em membrana corioalantóica nos permitiu observar desde o momento da formação da mesma e padronizar o melhor local dentro deste anexo embrionário seroso, para a colocação do Metil Jasmonato. A formação da membrana embrionária foi observada a partir do 3º dia, embora muitos protocolos afirmem que isto ocorre tão somente no 4º dia após o período inicial de incubação.

As figuras 68 e 69 ilustram a visualização do embrião no ovo, no período de observação e manipulação, durante os ensaios.

Contudo, a visualização da CAM e dos anexos variam de ovo para ovo, mesmo dentro da mesma espécie. Observamos também que a albumina é mais facilmente extraída nas primeiras 48 horas, ocorrendo menor risco de inviabilizar o embrião em desenvolvimento. Sendo assim, isto permite que o ovo seja aberto após 48 horas do início do desenvolvimento do embrião. Considerando, entretanto, que o sistema imunológico da ave somente começará a ser desenvolvido a partir do 6º. dia de incubação com a formação do Timo. (DIBNER; KNIGHT; KITCHELLI, 1998), preferimos manter as condições protocolares anteriores, para que não expuséssemos o ovo, contendo o embrião, de forma prematura ao risco de contágio dentro da incubadeira.

Figura-68 Ilustração do surgimento da CAM a partir das 48 horas, usando um filtro permitindo somente a impressão de cores âmbar, foto feito em Sony Cyber Shot 8 MP/ Transformada em Programa PHS.

Figura-69: Embrião fotografado após 72 horas de incubação.

A aplicação de Metil Jasmonato diretamente sobre a CAM, na faixa concentração entre 1 mM e 10mM resultou na diminuição do calibre e do número de ramificações vasculares. Na faixa de concentrações entre 1 μ M e 100 μ M, a exposição ao Metil Jasmonato associou-se a um grande número de brotamentos vasculares frágeis, anastomosados, muitas vezes curtos e com terminações disfuncionais (Figura 70). Algumas das disfunções observadas podem ser examinadas em maior detalhe na figura 71.

Figura -70: Efeito de Metil Jasmonato sobre a angiogênese in vivo. A: 10 mM; B: 1mM; C: 100 μ M; D: 10 μ M; E: 1 μ M; F: 100nM; G e H: controles. Microscopia de campo claro das membranas distendidas sobre lâminas de microscopia, sem coloração, aumenta de 2x.

Figuras-71: Exemplo das imagens de brotamento capilar induzidas pelo Metil Jasmonato. Fotografias da membrana de um embrião tratado com $7,5\mu\text{M}$ de Metil Jasmonato, preparada sobre lâminas de microscopia, fotografada em campo claro num microscópio Jenamed em 250x por uma câmera Canon Powershot 640.

Diversos algoritmos de processamento manual das imagens digitais foram testados durante a padronização do ensaio. Em todos os casos foi importante corrigir o efeito de sombra da imagem estereoscópica, o que passou a ser feito com a captura de uma imagem do campo sem as amostras, nas mesmas condições utilizadas para as medidas. . Quando o conteúdo dos vasos não permitiu um bom contraste, como se observa nas imagens A e D da figura 72, as imagens digitalizadas em microscopia de campo escuro ajudaram a observação de detalhes da estrutura da árvore vascular. Não foi possível obter um procedimento geral para tais padronizações. Há de observar que os vasos progridem durante o seu desenvolvimento e expansão, de formas diferentes

O efeito da adição do Metil Jasmonato sobre as CAM foi analisado a partir de imagens de campo claro e de campo escuro, mas muitas vezes as imagens obtidas mostraram artefatos que inviabilizaram a análise quantitativa dos resultados. Por exemplo, efeitos de sombra, como os mostrados na imagem C da figura 72 ou perda de sensibilidade, como na imagem F da figura 72. Somente quando o conteúdo dos vasos permitiu um bom contraste, e a correção de sombra foi utilizada, as imagens de campo claro foram utilizadas para a construção das imagens binárias.

Este tipo de análise ainda pode ser bastante refinado e a melhora das condições de processamento das amostras e de coleta das imagens digitais deverá ser acompanhada de desenvolvimento metodológico para análise destas imagens, no futuro.

Figura - 72: Exemplo de imagens da CAM em que o contraste não permitiu o estudo quantitativo do crescimento de vasos nas membranas corioalantoicas de embrião de galinha. Fotografias da membrana de um embrião não tratado, preparada sobre lâminas de microscopia e digitalizadas em campo claro (A e D) e em campo escuro (B e E), aumentos de 2x (A e B) e 7x (D e E). E e F: Imagens calculadas a partir da divisão das imagens de campo claro pelas de campo escuro, subtração da média da intensidades obtidas das componentes verde e azul da componente vermelha da imagem RGB e conversão em arquivos binários, mostrando efeitos de sombra e perda de sensibilidade para os vasos mais delicados.

As imagens referentes ao ensaio mostrado na figura 70 mostraram um conjunto de triplicatas que permitiu a quantificação das áreas de vasos. Os resultados estão mostrados no gráfico 16 e exemplificam a variabilidade encontrada desde o início do desenvolvimento metodológico, além do efeito do MeJa sobre os vasos da CAM.

Gráfi

co-16: Efeito de Metil Jasmonato sobre o crescimento de vasos nas CAM. Área dos vasos, medidos a partir das imagens binárias dos vasos. Imagens binárias calculadas com o programa Image J a partir das fotos digitalizadas em campo claro após divisão pela imagem do fundo e subtração da média das componentes verde e azul da componente vermelha da imagem RGB.

O Metil Jasmonato carregado em lipossomos mostrou efeito comparável ao do composto em água (figura 73). As medidas de áreas de vasos foram muito parecidas para as amostras e com os controles e não permitiram identificar o efeito de concentrações submilimolares do MeJa carregado neste tipo de formulação. Concentrações muito altas do veículo são sujeitas a efeitos indesejáveis de proliferação vascular.

Evitamos trabalhar nessas concentrações, porque o efeito citotóxico do MeJa seria superestimado após a comparação com os controles de veículo.

Figura 73 – Efeito de Metil Jasmonato carregado em água (A, C, E e G) ou em lipossomos (B, D, F e H) sobre a angiogênese in vivo. A e B: controles do veículo; C e D: 30 μ M ; E e F: 15 μ M; G e H: 7,5 μ M. Microscopia de campo claro aumento de 2x.

5.4 O Cultivo de Melanoma de Murino em CAM.

Dentre as características deste tipo de células, a facilidade de proliferação e a capacidade de formação de massas castanhas ou negras, produtoras de melanina, favoreceram a visualização do seu crescimento sobre a CAM. Os tumores cresceram em torno de vasos calibrosos da membrana corioalantóica, como mostrado nas figuras 74 a 77. Tal fenômeno já havia sido descrito por alguns autores (CHAMBERS et al.,1992) mostrando o poder das células de Melanoma Murino extravasarem-se junto aos vasos, especialmente as arteríolas. Relatos anteriores mostraram que as células do melanoma murino B16 – F10,têm uma grande potencialidade de penetrar nos vasos, conduzindo-se entre as células endoteliais, para o ambiente interno endotelial. Este processo se dá, sem que ocorra a destruição da parede do vaso, mantendo-os íntegros (DE BRUYN; CHO, 1982).

O melanoma apresentou características previamente descritas na literatura. Houve a ocorrência de várias formações de massas tumorais de melanoma, nas membranas corioalantóicas. As massas tumorais cresceram em camadas estratiformes, de formato e bordas irregulares. As massas apareceram geralmente em torno ou paralelas aos vasos, que por suas vezes, se mostraram rompidos ou totalmente tomados pela colônia celular do melanoma em crescimento.

Figura-74: Massas tumorais de melanoma crescendo juntos aos vasos da CAM

Outro fenômeno previsto em literatura e observado em nossas culturas foi o efeito sobre os vasos, na presença das massas tumorais extensas da membrana corioalantóica. Ocorreu um aumento na área dos vasos e uma descontinuidade da parede do vaso, no fenômeno da angiogênese tumoral. Muitas vezes, com o extravasamento de fluido endovenoso para fora do lúmen vascular. Este efeito foi bem percebido nas imagens de campo escuro, como mostrado na figura 75

Figura-75: Vasos descontinuados na presença de células de melanoma de murino.

Os vasos menores revelaram crescimento desordenado e sem manutenção do padrão de hierarquias e ângulos de ramificação, no seu conjunto. Além das frestações observadas nas paredes dos vasos formados, foi observado o aumento considerável de vasos em torno da massa tumoral, como mostrado na figura 76. Todos estes fatores são importantes para o processo de metástase.

Figura-76: Formação desordenada de vasos associada à proliferação de células cancerígenas sobre a CAM.

A medida de áreas de vasos em amostras de membranas onde as células de melanoma formaram massas foi dificultada pela coloração dos tumores.

Entretanto, em regiões contíguas a essas massas, observamos uma variação de cerca de 20%, para mais, na área de vasos das amostras em relação aos controles. A variação entre amostras de um mesmo tipo é de 10 a 12%, intraensaio.

A avaliação do crescimento tumoral pode ser feita com o esgotamento do sangue dos vasos, permanecendo apenas as massas coloridas do tumor. Ensaios do efeito antitumoral do Metil Jasmonato aplicado sobre CAMs inoculadas com o melanoma murino revelaram efeito parcial do Metil Jasmonato em dose única acima de 1 μ M, com regressão importante da dimensão máxima atingida durante o crescimento das massas tumorais, na dose de 1 milimolar (figura 77).

Figura 77 – Aspecto do crescimento do tumor sobre a CAM após 10 dias de inoculação de $1,5 \times 10^4$ células de melanoma B16-F10/ovo sem tratamento (A e B) ou após tratamento com Metil Jasmonato 100nM (C e D), 10 μ M (E e F) ou 1 mM (G e H). As membranas foram distendidas entre lâmina e lamínula e o mesmo campo foi fotografado com Lupa estereoscópica Nikon em campo claro (A, C, E e G) e campo escuro (B, D, F e H), aumento 7x.

6 Discussão

Os resultados apresentados nesta tese demonstram, pela primeira vez, a influência do Metil Jasmonato sobre a angiogênese *in vivo*, corroborando as propostas a respeito de sua aplicabilidade como medicamento antineoplásico. Adicionalmente, oferecem a padronização inicial de um modelo experimental derivado do tradicional modelo de angiogênese da CAM para o estudo de angiogênese em ambiente neoplásico, crescimento tumoral e metástase.

Pudemos verificar em células endoteliais humanas não neoplásicas um efeito citotóxico análogo ao descrito por Eliezer Flescher e colaboradores em células tumorais (FINGRUT; FLESCHER, 2002). As culturas de HUVEC mostraram um efeito bifásico do Metil Jasmonato sobre o crescimento vascular. Concentrações de Metil Jasmonato acima de 1 mM impediram o crescimento celular das HUVECs em cultura, enquanto concentrações iguais ou menores do que 100 μ M mostraram um crescimento equivalente ao das células não expostas, como mostra o gráfico 1. O tempo de dobramento não foi modificado, nem a densidade de confluência. Estas doses são, de fato, mais baixas do que as relatadas por diversos autores como citotóxicas para tumores *in vitro* e *in vivo* (ROTEM et al., 2003, 2005). As células de melanoma murino mostraram toxicidade nas mesmas concentrações descritas na literatura, ou seja, acima de 1 mM (Gráfico 2). É importante notar que este resultado se contrapõe a relatos anteriores a respeito da seletividade do MeJa para células tumorais (FINGRUT; FLESCHER, 2002). Diante deste achado, verificamos o efeito de carreadores sobre a toxicidade para os dois tipos celulares e buscamos compreender se o mecanismo do efeito tóxico sobre o endotélio poderia ser o mesmo descrito anteriormente para as células neoplásicas.

O uso de carreadores apresentou-se como uma estratégia experimental de verificar se a seletividade mencionada por Flescher e colaboradores poderia ser compartilhada com as células endoteliais. Neste caso, o alvo da ação antineoplásica do MeJa poderia incluir este tipo celular, além dos já tumores em que o composto já foi testado com sucesso anteriormente (ROTEM et al., 2003, 2005, FLESCHER, 2007).

De fato, a coincidência entre as doses no que diz respeito à susceptibilidade dos dois tipos celulares verificou-se com o composto puro, ou veiculado pelos carreadores estudados. O uso de carreadores lipídicos diminuiu discretamente a toxicidade do Metil Jasmonato sobre as HUVEC, que mantiveram alguma viabilidade em 4 mM de MeJa carregado em lipossomos, o que não ocorreu com o MeJa puro, em nenhum dos ensaios. O efeito sobre o tempo de dobramento foi idêntico sobre as HUVECs e sobre as células de melanoma, que também se mostraram ligeiramente mais susceptíveis ao MeJa puro do que carregado (Gráficos 1, 2 e 4 a 9). Porém, o veículo polimérico aumentou de três ordens de grandeza esta toxicidade, referendando a hipótese de que a distribuição do composto em sistemas biológicos pode ser relevante para os seus efeitos (Gráficos 1, 2 e 10 a 13). Com estes resultados, a análise quantitativa do Metil Jasmonato em formulações lipídicas, padronizada para verificar a incorporação e a perda do composto por diálise a partir dos lipossomos a partir dos espectros de CG-MS (Figuras 61 e 62), ganhou importância no nosso trabalho, uma vez que foi demonstrada a necessidade do estreito controle das doses empregadas. Todas as formulações testadas foram analisadas quantitativamente. Os lipossomos foram utilizados no mesmo dia, após diálise e a análise quantitativa foi realizada em uma alíquota do mesmo material que foi utilizado nos ensaios. O nanocarreador polimérico foi analisado para perdas do

composto carregado e a sua estabilidade foi confirmada pela Nanocore antes do envio das amostras para os ensaios.

É provável que a diminuição de toxicidade, no caso dos lipossomos (gráficos 6 a 9) deva-se à distribuição do Metil Jasmonato compartilhada entre as membranas celulares e as membranas da pseudofase lipídica, diminuindo a dose que efetivamente atinge as células ou modificando a cinética da sua distribuição na cultura. De acordo com esta hipótese, o tempo de dobramento das duas linhagens não foi modificado pela presença do carreador. Por outro lado, o ganho de toxicidade, no caso do carreador polimérico, (Gráficos 10 a 13) deve-se provavelmente a entrada facilitada por receptores de açúcares e à demanda aeróbica das células tumorais, bem como das células endoteliais. Neste caso, é relevante que a maior parte dos veículos poliméricos de açúcares é consideravelmente tóxica, em concentrações acima de 10 μ M. Em culturas celulares, o composto carregado e o veículo apresentaram diferenças de toxicidade de cerca de uma ordem de grandeza, pelo menos. O tempo de dobramento de ambas as linhagens celulares também não foi modificado durante a exposição a concentrações subtóxicas, um achado compatível com a hipótese inicial de que o alvo da ação tóxica do composto não seja modificado pela formulação. O efeito diferencial sobre as curvas de crescimento é mais explícito do que a medida da redução do MTT (Gráficos 10 a 13). No teste do MTT, Ambas as linhagens mostram efeitos equivalentes do veículo e do A-14, sugerindo que ocorre algum tipo de lesão reversível ou adaptação ao veículo do A14 nas primeiras 24h de exposição, envolvendo o metabolismo mitocondrial, e que não se reflete sobre o crescimento das culturas celulares. Efeito semelhante pode ter ocorrido com os lipossomos, pois os controles expostos ao veículo mostraram absorbâncias menores do que as do

controles não expostos (Gráficos 4 a 9). Entretanto, como o efeito do composto carregado não mostrou diferenças com relação ao efeito do composto puro, esta hipótese não foi adicionalmente investigada.

A coincidência das concentrações tóxicas para o efeito do Metil Jasmonato sobre as HUVEC e as células B16 -F10 de melanoma murino, confirmada também para o composto carregado, reuniu-se a uma evidência adicional da analogia proposta para o mecanismo de citotoxicidade. A semelhança dos aspectos morfológicos, observados durante a exposição das duas linhagens celulares, mostrou a presença de figuras de multinucleação e aspectos morfológicos compatíveis com processos de autofagia e apoptose (Figura 64) (KLIONSKI et al., 2008). Estes efeitos foram, posteriormente, confirmados pela análise do ciclo celular da HUVEC, por citometria de fluxo (figura 65).

A partir destes resultados, buscou-se compreender o mecanismo da ação citotóxica sobre o endotélio, nas culturas celulares, *in vitro*. Para os estudos de mecanismo, utilizou-se o composto puro. A ação tóxica sobre a mitocôndria foi investigada com um ensaio de citotoxicidade que reflete a atividade da succinato desidrogenase, uma enzima importante do Ciclo de Krebs, o estudo da redução do MTT (DENIZOT; LANG, 1986).

Em culturas confluentes de HUVECs, ou nas culturas de melanoma murino B16-F10, não se observou nenhum efeito sobre a redução do MTT em doses subtóxicas do MeJa. A citotoxicidade, em ambos os casos, apresentou-se em concentrações próximas de 1mM.

Em culturas não confluentes de HUVECs, ocorreu um aumento consistente na redução do MTT em doses subcitotóxicas, compatível com um efeito desacoplador sobre a mitocôndria ou um estímulo à proliferação celular (Gráfico 3). Como o tempo

de dobramento celular não foi modificado nestas concentrações, quando analisado pela curva de crescimento, compreendeu-se este fenômeno como refletindo a susceptibilidade das HUVEC ao efeito desacoplador do Metil Jasmonato sobre as mitocôndrias. Obviamente, as culturas celulares são analisadas em condições iniciais de subconfluência, o que indica que o MTT foi, de fato, informativo quanto ao alvo da citotoxicidade do MeJa. Efeito similar já havia sido descrito em células vegetais que, após 1h de tratamento, apresentam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, perda do potencial transmembrana e alterações morfológicas que precedem e são importantes no processo de morte análogo também foi descrito em células e mitocôndrias de células celular (ZHANG, XING, 2008). Efeito tumorais, em que se demonstrou, com o uso de inibidores, que o Metil Jasmonato induz a morte celular desencadeada pela abertura do PTPC (ROTEM et al., 2005, GOLDIN et al., 2007).

A sugestão de que a citotoxicidade do MeJa sobre as HUVECs depende de um efeito sobre a mitocôndria foi confirmada com a demonstração da indução de apoptose, que é a consequência final de sua ação descrita sobre as células neoplásicas. Adicionalmente, era preciso confirmar se o ciclo celular não sofria alterações durante a exposição a concentrações inferiores a 1mM do MeJa.

Os ensaios de citometria mostraram que concentrações citotóxicas do Metil Jasmonato podem induzir apoptose e parada do ciclo celular em G1 em 18h de exposição (Figura 65, tabela 2), um efeito que precede as alterações observadas nos ensaios de citotoxicidade explicitada pela redução do MTT a partir das 24h (Gráfico 1), ou pela análise das curvas de crescimento celular (Gráfico 1). Em concentrações menores, o ciclo celular foi totalmente preservado (Figura 65, tabela 2). Entretanto, o achado de que as HUVECs mostram uma discreta variação na

marcação positiva com o Laranja de Acridina, sugere que, mesmo nestas concentrações, a exposição ao MeJa possa favorecer a ocorrência de morte celular, desde que combinada a outro agente de lesão (Tabela 2). A marcação do compartimento ácido por este corante não era esperada nas concentrações citotóxicas, porque a apoptose implica na redução de toda a atividade de lisossomal, até o final do processo de formação dos corpúsculos apoptóticos. Entretanto, o fato de que a fração de células positivas para esta marcação tenha aumentado na exposição das HUVECs a concentrações 10 μ M de MeJa, quando ciclo celular não foi modificado, sugere que algum mecanismo de resistência do tipo autofagia tenha sido desencadeado na população celular (KLIOSNKI et al., 2008). Estes mecanismos são reversíveis e representam estratégias gerais de sobrevivência a condições ambientais adversas (KLIOSNKI et al., 2008). Um efeito compatível com as alterações observadas nestas concentrações, as células diminuíram a produção de VEGF nas primeiras 4h de exposição (Tabela 2). A variação das concentrações de VEGF tem efeitos importantes sobre a diferenciação endotelial.

A diminuição no VEGF observada nas concentrações mais baixas de MeJa, associou-se a evidências morfológicas de que a célula sofre adaptação ou mesmo algum grau de lesão reversível, nas primeiras 24h de exposição ao MeJa mostradas na figura 64. Neste caso, a redução da sinalização para proliferação pode ser um efeito transitório, mas relevante à sobrevivência celular. No caso das células endoteliais, a plasticidade da microcirculação depende do controle estreito de proliferação e morte celular, orquestrado pelos diversos fatores pró- e anti-angiogênicos, para a manutenção da homeostasia.

A diminuição da concentração de VEGF é um recurso de sobrevivência porque impede a proliferação e a diferenciação celular do endotélio. Entretanto, o seu

aumento promove o efeito contrário. Assim, a variação observada do VEGF sugere que as células endoteliais diminuiriam a sua proliferação nas concentrações mais baixas de MeJa, mas não nas mais altas, que claramente desencadeiam a citotoxicidade. Algumas hipóteses podem explicar este aparente paradoxo. A cronologia dos eventos observados sugere que o aumento na concentração de VEGF, produzido pelas células expostas às doses citotóxicas de Metil Jasmonato, corresponda a um sinal precoce e transiente de sobrevivência das células endoteliais. Da mesma maneira, não foi possível excluir, sem a realização de ensaios adicionais, outros efeitos decorrentes do desacoplamento mitocondrial. Em todos os casos, o efeito tóxico pode ser amplificado pelo sinal de proliferação, uma vez que a célula depende de sua maquinaria de produção de energia para proliferar. O resultado final é a indução de morte celular por apoptose, como verificado anteriormente com as linhagens tumorais (FLESCHER, 2007).

Especula-se que se os efeitos de toxicidade e modulação da produção do VEGF, combinados, possam ser importantes para produzir o efeito de aumento na fragilidade vascular, decorrente de efeitos sobre a maturação dos vasos durante a angiogênese, como verificado anteriormente (THURSTON et al., 1999; FINDLEY et al., 2007). A permeabilidade vascular, além da proliferação, é controlada pelo VEGF, que se liga aos seus receptores tirosina quinase (no caso da angiogênese, principalmente o VEGFR2) e pelas angiopoietinas (que se ligam ao receptor Tie-2). O VEGF aumentado promove a quebra do receptor e inibe a estabilização mediada pela angiopoietina-1 (THURSTON et al, 1999; FINDLEY et al, 2007). Por outro lado, a diminuição do VEGF na presença de angiopoietina-2 também resulta em baixa maturação vascular, proliferação celular aumentada e fragilidade.

A discussão do mecanismo foi abordada pelo grupo a partir da proximidade estrutural e funcional do composto com as prostaglandinas (PEREIRA LOPES et al., 2009, in press).

A exemplo de outros autores, esta proximidade estrutural do Metil Jasmonato com as prostaglandinas já havia sido considerada. Em princípio é maior com as moléculas da série E, pela presença do anel ciclopentanona. Entretanto, as prostaglandinas da série E são conhecidas por favorecerem o crescimento tumoral e a angiogênese, exceto em algumas situações muito particulares, em que o inverso parece ocorrer (CONTI, 2007). Considerando os efeitos do Metil Jasmonato de inibição da proliferação endotelial, a hipótese de uma proximidade funcional com a PGE_2 não parecia adequada. A via COX-2/ PGE_2 tem múltiplos efeitos pró-angiogênicos. A PGE_2 pode aumentar a expressão do VEGF-A, de VEGF-C e -D, além de receptores de citocinas que participam do crescimento e da organização dos neovasos (SU et al., 2004, PAN et al., 2008).

A expressão da COX-2 é desencadeada pelo estresse de cisalhamento ("shear stress") e por hipóxia, através da ação do fator de crescimento dependente de hipóxia (HIF). Resulta que a COX-2 é pouco expressa em condições basais, mas aumenta rapidamente em tecidos inflamados, em regeneração ou crescimento acelerado (GREENHOUGH et al, 2009).

De fato, os resultados obtidos no teste do MTT, com as doses subtóxicas do Metil Jasmonato não permitiram excluir um efeito sobre a expressão de COX-2 e a alça autócrina de estímulo à produção de PGE_2 . É conhecido que culturas confluentes de células endoteliais expressam menos COX-2 e produzem menos PGE_2 do que as culturas subconfluentes (JIANG et al., 2004). Assim, é possível que o estado metabólico das HUVECs determine alguma diferença na sua susceptibilidade aos

efeitos do Metil Jasmonato, como sugerem as diferenças observadas nos ensaios que deram origem aos gráficos 1 e 3. Por outro lado, o conjunto dos efeitos observados sugere uma proximidade funcional entre o Metil Jasmonato e as prostaglandinas das classes A e J.

Esta abordagem foi inaugurada por Conti, que menciona o aumento da atividade anti-tumoral do Metil Jasmonato resultante da introdução de uma dupla ligação no anel ciclopentanona, de forma a produzir uma estrutura de ciclopentenona substituída, correspondente à das prostaglandinas A e J (CONTI, 2006). A analogia funcional entre esses compostos justifica-se pela habilidade do Metil Jasmonato em induzir a parada de maturação de células neoplásicas em concentrações inferiores às necessárias para produzir morte celular.

O próprio anel 2-ciclopentenona sem substituintes foi demonstrado como uma molécula pró-apoptótica para as HUVECs, em concentrações tão baixas quanto 0,25 μ M (VOSSELER; WEBER, 2003).

Os principais mecanismos propostos para a citotoxicidade dessas prostaglandinas são o bloqueio da ativação do NF κ B e a ativação do PPAR γ (BISHOP-BAILEY; HLA, 1999; STRAUS et al, 2000). Ambas as vias são relevantes para o controle do crescimento vascular e da diferenciação das células endoteliais *in vivo*. Os fatores de transcrição dependentes de NF κ B promovem a expressão de VEGF e de outros fatores de crescimento. Em miofibroblastos, a ativação do receptor do PPAR γ por seus agonistas induz a expressão de VEGF e diminui a inflamação e a ativação do NF κ B (CHINTALGATTU et al, 2007).

Os efeitos de diminuição de VEGF em células endoteliais podem derivar da diminuição da atividade da COX-2 e da menor produção de PGE₂, desencadeada a nível nuclear. A supressão da transcrição da COX-2 ocorre por vias dependentes e

independentes do fator de transcrição AP-1 (SUBBARAMAIAH et al, 2001). A inibição da COX-2 é particularmente importante no microambiente neoplásico, além do embrionário. Várias das propriedades anti-neoplásicas da PGJ_2 e de outros ligantes de $\text{PPAR}\gamma$ resultam da sua capacidade de inibir a expressão de COX-2 e a biossíntese de prostaglandinas (SIMMONS et al, 2004).

A expressão de COX-2 e a produção de PGE_2 são maiores nas células dos brotos vasculares do que na monocamada confluyente do endotélio de vasos maduros. Nos vasos tumorais, em ativo crescimento, a PGE_2 é o sinal autócrino para o brotamento (JIANG et al, 2004). Portanto, a inibição da via COX-2/ PGE_2 resulta no bloqueio da proliferação de vasos funcionais em ambiente tumoral.

As alterações na expressão do VEGF e o efeito diferencial do MeJa em culturas confluentes e subconfluentes sugerem que a expressão de COX-2 ou as vias dependentes de PGE_2 possam ser modificadas pela ação do MeJa. Novos ensaios devem ser desenhados para investigar esta hipótese.

A expressão do receptor VEGFR2 está descrita como um alvo adicional da ativação do PPAR em células endoteliais. Em HUVECs, foi descrito para a prostaglandina J_2 um efeito anti-angiogênico tardio, associado a um aumento moderado na expressão de VEGF e uma diminuição na expressão do receptor VEGFR2, transiente e auto-limitada (FUNOVICS et al., 2006). Apesar de serem efeitos sinérgicos, estes mecanismos não são interdependentes. Por outro lado, foi demonstrado que a mitocôndria é o principal alvo celular do Metil Jasmonato, durante a indução de morte celular programada (ROTEM et al, 2005; GOLDIN et al., 2007). A proximidade funcional das mitocôndrias de células endoteliais e neoplásicas foi sugerida anteriormente, implicando que a seletividade do MeJa

relacione-se a características funcionais dessa organela (De GIORGI et al, 2000; De GIORGI et al, 2002).

De maneira compatível com os efeitos previamente relatados das prostaglandinas contendo o anel ciclopentenona (FUNOVICS et al., 2006), os efeitos observados *in vivo* neste trabalho foram surpreendentemente importantes, não somente na faixa de concentrações acima de 1 mM, as mesmas concentrações que se mostraram citotóxicas *in vitro*. A toxicidade observada no modelo dos ovos embrionados permitiu o teste das mesmas concentrações de MeJa utilizadas *in vitro* (Gráfico 14).

A comparação do efeito local do MeJa e da PGE₂, em concentrações equivalentes, mostrou que nas concentrações em que o MeJa diminui a densidade vascular, a PGE₂ promove o seu aumento, com a proliferação de vasos finos e retorcidos na região da CAM que fica justaposta ao suporte de papel (Figura 67). Se, por um lado o efeito antiangiogênico associado às doses tóxicas do MeJa pode ser observado desta forma do modelo da CAM, o mesmo mostrou-se muito pobre para documentar os efeitos sugeridos pelos ensaios com as culturas celulares em concentrações mais baixas de MeJa.

Para investigar especificamente os efeitos do MeJa em concentrações sobcitotóxicas, foi necessário aperfeiçoar e refinar tecnicamente o modelo da CAM. Diversas iniciativas de refinamento técnico já foram realizadas anteriormente e estão descritas na literatura. De forma geral, muitas delas objetivaram a diminuição do efeito irritante do suporte utilizado para difusão dos compostos em teste. Vários suportes já foram utilizados para difusão de substâncias em modelos de angiogênese *in vivo*: espojas polivinílicas (ANDRADE et al., 1987) , pré Matrigel ou alginato (MALINDA et al., 1999) e colágeno (GREILING; CLARK, 1997). Em

princípio, todos estes suportes podem ser utilizados sobre a CAM, porém esta membrana é muito susceptível a efeitos de irritação local, mesmo não tendo uma resposta imune completa a substâncias exógenas até bem tarde no desenvolvimento do embrião, que é extenso durante o período do ensaio (figuras 68 e 69) (ROSENBRUCH, 1989 e 1990).

O refinamento técnico obtido neste trabalho foi realizado sobre o próprio modelo da CAM (RIBATTI et al., 1996, 2000 e 2001).

As principais modificações da técnica original foram a ligadura dos principais vasos que irrigam a membrana durante a coleta, a montagem do material entre lâmina e lamínula e a eliminação do disco de papel filtro como suporte para administração do composto (Figuras 46 a 49). Além disso, o tempo de processamento das amostras e a técnica de manipulação foram melhorados, evitando interferências devidas à perda acentuada do conteúdo dos vasos e facilitando o exame da porção distal do plexo vascular da CAM. A técnica de processamento das amostras influenciou diretamente na qualidade dos resultados, porque a preservação do conteúdo dos vasos garantiu o bom contraste das imagens obtidas a partir de microscopia de campo claro em amostras a fresco (Figura 72).

Enquanto o protocolo anterior (WILTING et al., 1991; WEST et al., 2001) baseia-se na leitura da angiogênese na região da CAM que se superpõe ou está próxima ao suporte utilizado para difusão radial do material de estudo, o protocolo desenvolvido permitiu observar a rede vascular em uma superfície maior das membranas carioalantóicas. A principal vantagem é o aumento da área analisada, mas esta não é a única vantagem.

A aplicação do Metil Jasmonato nos ensaios de angiogênese foi feita diretamente sobre a CAM, tanto para a substância pura quanto para a mesma

carreada nas diversas formulações utilizadas. A análise dos resultados preliminares mostrou que os efeitos sobre a angiogênese são razoavelmente homogêneos em toda a microcirculação da CAM e reprodutíveis entre os indivíduos do mesmo ensaio e em ensaios independentes.

A escolha da porção distal da árvore circulatória para análise das imagens digitais deveu-se à busca de uniformidade da região de amostragem, aliada ao fato de que a expansão de capilares é mais evidente nesta região. Quando se verificaram os efeitos anti-angiogênicos associados à doses tóxicas dos compostos testados, a diminuição gradual de calibre das ramificações vasculares desapareceu e deu lugar a um grande número de brotamentos frágeis, muitas vezes curtos e com terminações disfuncionais (Figuras 70 e 71).

A análise das imagens digitalizadas foi realizada a partir da densidade dos vasos através da medida simples da área dos vasos medida em pixels, nas fotos capturadas e transformadas em imagens binárias após subtração da imagem do fundo, para corrigir os efeitos de iluminação da amostra. Para a observação dos efeitos de doses citotóxicas, esta forma de análise é interessante e refletiu as diminuições que podiam ser percebidas a partir da observação direta das fotos (Figura 70 e gráfico 16). A representação de uma síntese de vários resultados e a possibilidade de comparações entre resultados independentes dependem de se poderem quantificar os dados obtidos. Obviamente, numa análise tão simples, perdem-se informações quanto a ângulos de bifurcação e comprimento de segmentos, detalhes que não podem ser analisados a partir da área total de vasos. É possível, entretanto, prosseguir no desenvolvimento metodológico de forma a obter dados quantitativos sobre estes parâmetros, o que será abordado em breve pelo grupo. A análise quantitativa da angiogênese no modelo da CAM foi discutida

de forma muito elegante por Blacher et al. (2005). Segundo esta autora, é possível descrever a angiogênese embrionária que ocorre na CAM de forma quantitativa a partir de uma análise mais elaborada das redes vasculares, considerando-se a ordem das ramificações, a cobertura uniforme de áreas da membrana por vasos de pequeno calibre, entre outras características mensuráveis. Requer-se a coleta de imagens em vários aumentos e uma análise hierarquizada a partir dos vasos mais delgados. Entretanto, neste caso, foi empregada uma técnica de fluorescência, e foi analisado o desenvolvimento embrionário e não interferentes que possam promover, por exemplo, vazamentos do conteúdo dos vasos e outras anomalias estruturais que modifiquem a distribuição da sonda no interior da rede.

O modelo modificado permitiu comparar efeitos morfológicos que a análise do disco de papel não foi sensível para evidenciar (Figuras 67 e 70). A abordagem inicial foi qualitativa, depois foi analisada a área da representação das redes vasculares em imagens em duas dimensões, transformadas em imagens binárias. Foi possível perceber que doses subcitotóxicas de MeJa resultam em modificações estruturais da rede de microcapilares. Mais recentemente, o refinamento dos procedimentos da coleta do material da CAM melhorou a qualidade das imagens o suficiente para viabilizar a aplicação de análises mais complexas, mesmo sem o uso de sondas fluorescentes. O objetivo desta etapa dos trabalhos, que se encontram ainda em andamento, é obter um método padronizado e barato para realizar a análise do efeito de agentes diversos sobre a angiogênese.

A análise dos resultados nas doses micromolares do composto foi um desafio menos trivial do que a análise dos resultados obtidos com as doses citotóxicas. Isto porque, no limite da técnica morfológica, pretende-se medir a perda funcional de vasos terminais. Esta perda, no caso do MeJa, aparentemente reflete-se pela

presença de curvaturas e anastomoses, que não necessariamente correlacionam-se com a área da rede vascular projetada em duas dimensões (Figura 70 e Gráfico 16).

Os resultados são muito susceptíveis às condições de coleta das imagens e, em qualquer caso, a binarização acaba inevitavelmente por excluir os vasos menores (Figura 72). Se as alterações observadas com as doses citotóxicas resultam em uma perda estrutural em que a rede é comprometida de forma a preservar grosseiramente a hierarquia das ramificações a partir dos vasos maiores, isto não ocorre com as doses mais baixas do Metil Jasmonato. Em alguns casos, as imagens obtidas mostraram um contínuo de vasos anastomosados, sem delimitações terminais definidas e com muitos pontos hemorrágicos. Brotamentos curtos e vasos muito finos são abundantes e, dependendo da qualidade das imagens e do tipo de tratamento, podem ser excluídos da quantificação (Figura 71). Foram definidos limites de sensibilidade para o calibre dos vasos, ajustando-se as condições de captura, coletando as imagens de fundo e padronizando os parâmetros do algoritmo de binarização, mas ainda foi obtida uma forma automatizada e geral para a análise das imagens com as alterações estruturais resultantes da exposição às doses subcitotóxicas do MeJa. Parte dos dados de observação foi obtida com o auxílio de um microscópio, por transiluminação. O maior aumento, mesmo com a diminuição do campo de análise trouxe uma riqueza maior de informações, como mencionado por Blacher em seu trabalho (2005), mas a análise destes dados foi apenas descritiva e pode ser mais sujeita a erro de amostragem, uma vez que a análise de campos consecutivos nem sempre é fácil em membranas fragilizadas pelo processamento necessário para observação ao microscópio.

A pergunta que se desenha, então, a partir dos resultados obtidos é como quantificar a perda funcional da microcirculação a partir dos padrões da rede vascular? Este problema foi recentemente revisto por McDonald e Choyke em 2009 e técnicas sofisticadas são propostas para compreender detalhes do processo de angiogênese e analisar efeitos clinicamente relevantes. Tentamos utilizar algoritmos combinando imagens de campo claro e campo escuro, com resultados que acrescentaram pouco ao que foi obtido apenas com as imagens de campo claro. O mais adequado, provavelmente será utilizar sistemas dinâmicos que permitem estudar fluxo, extensão do leito vascular, calibre e perviedade dos vasos, além de fornecerem dados relacionados à estrutura da rede. Por exemplo, um sistema de análise vascular automatizada foi desenvolvido no Academic Medical Center da Universidade de Amsterdam (www.microvisionmedical.nl). Este sistema permite obter os histogramas da distribuição das relações comprimento/diâmetro, área/diâmetro e fluxo/ diâmetro de vasos a partir de medidas não invasivas da superfície de tecidos, *in vivo*. A técnica produz dados experimentais em vídeo e depende de equipamentos de captura de imagem, armazenamento e tratamento de dados mais complexos do que os utilizados neste trabalho. A coleta é feita com um equipamento portátil chamado MicroScan (Microvision) cuja tecnologia baseia-se num sistema de imagem de campo escuro produzidas pela aplicação de um feixe de luz polarizada, pulsada, sobre a superfície do tecido. O sistema foi desenvolvido a partir da tecnologia de microscopia intravital sob epi iluminação com luz polarizada, chamada de OPS Imaging, do Inglês *Orthogonal Polarization Spectral imaging* e permite a observação *in vivo* de superfícies de tecidos a pequena distância (MATHURA et al, 2001).

Mais recentemente, sistemas de luz pulsada assíncrona foram desenvolvidos, chamados genericamente de SDF, do Inglês *Side-stream Dark Field imaging*. Estes métodos ainda apresentam muitas limitações e são sujeitos a artefatos. As tentativas de utilização do equipamento para medir as nossas amostras, *in vivo*, resultaram em imagens sujeitas a artefatos devidos a movimentos do embrião e à compressão da ponta analisadora sobre a CAM. A compressão é apontada como uma fonte importante de desvios nas medidas realizadas com este equipamento. Além disso, a análise da estrutura da rede também depende de algoritmos de binarização é feita de forma semi-manual.

Igualmente, não foi possível mostrar diferenças qualitativas ou quantitativas entre as CAMs expostas a doses subtóxicas do Metil Jasmonato carregado em lipossomos, em comparação com as mesmas doses de composto não carregado (Figura 73). A formulação contendo apenas os lipossomos sem o Metil Jasmonato não mostrou efeitos tóxicos. Nos ensaios de toxicidade, o uso da albumina fina como veículo para o Metil Jasmonato resultou numa letalidade baixa, até menor do que a observada nos ensaios de angiogênese, quando a substância foi aplicada diretamente sobre a CAM (Gráfico 14). Da mesma forma que com os lipossomos, talvez a associação com a albumina tenha diminuído a dose do Metil Jasmonato que efetivamente chegou ao embrião. Este efeito foi observado no comportamento das curvas de sobrevivência, em que o MeJa dissolvido na albumina pode ser utilizado em doses mais altas do que as empregadas nos ensaios de angiogênese. O composto pode ser utilizado nos ovos em que foram semeadas as células do melanoma murino B16-F10, com citotoxicidade equivalente à observada nos ovos sem o tumor (Gráficos 14 e 15).

O uso de carreadores poliméricos mostrou toxicidade acentuada do veículo nos ensaios *in vitro* e inviabilizou a análise *in vivo* (Gráficos 10 a 13). Não foram observadas evidências de que a via ou a forma de administração do Metil Jasmonato tenham modificado os alvos de seus efeitos sobre a angiogênese.

Em resumo, efeitos convergentes, embora distintos, foram observados *in vivo* entre as concentrações micromolares e milimolares de Metil Jasmonato. Doses mais altas impactaram o crescimento vascular, resultando em menores densidades de brotamentos vasculares, provavelmente devido ao comprometimento grosseiro do metabolismo energético e morte celular aumentada que se seguiu ao estímulo transiente da produção de VEGF. Na faixa de concentrações micromolares, a proliferação aumentada e desordenada resultou na produção de vasos disfuncionais nas CAMs expostas a doses menores. Este efeito, mais complexo do que a citotoxicidade direta, não encontra relatos anteriores na literatura, para nenhum tipo celular. Não foram observados efeitos sobre o ciclo celular das HUVECs nestas concentrações, exceto pelo aumento discreto na marcação com Laranja de Acridina, em 10 μ M, atribuível à tentativa das células em sobreviver por meio de algum grau de autofagia. O desequilíbrio redox está certamente envolvido nos mecanismos de senescência celular (MULLER, 2009), porém os resultados apresentados na Tabela 2 somente nos permitem considerar a indução de senescência das células endoteliais nas concentrações citotóxicas do Metil Jasmonato.

A menor produção de VEGF observada na concentração subtóxica de 10 μ M é compatível com o padrão de alteração vascular observado *in vivo* (Figura 70, 71 e 73). Efeito semelhante foi descrito em tumores e no epitélio uterino (BENJAMIN; KESHET, 1997; MATSUMOTO et al, 2002).

Entretanto, existem outros mecanismos relevantes implicados na desorganização da estrutura vascular, além daqueles diretamente relacionados a via COX-2/PGE₂. Alguns desses mecanismos somente podem ser revelados e estudados em modelos complexos, porque dependem da interação entre células endoteliais, pericitos e células musculares lisas da parede vascular (LEE et al., 2006). A PGJ₂ é capaz de promover a conversão adiposa em uma série de linhagens celulares, de bloquear a miogênese através da inibição da expressão do promotor de MyoD e de induzir a expressão do PPAR γ relacionado a angiopoietina (PGAR) em células endoteliais (HU et al., 1995, HUNTER et al., 2001, SALCEDO et al., 2003).

A conversão adiposa e o bloqueio da miogênese resultam em perda estrutural e em comprometimento da sinalização por pericitos/células murais na parede dos neovasos. A proteína PGAR (sigla que nomeia uma Angiopoietina associada ao PPAR- γ), fortemente relacionada à angiopoietina-2 é prevalente em tecidos placentários e responde pelo remodelamento vascular (YOON et al, 2000). Os resultados obtidos sugerem que mais de um alvo celular pode ser responsável pelos efeitos observados. A observação do desequilíbrio entre os fatores pro e anti angiogênicos foi obviamente favorecida no modelo da CAM. Da mesma forma, o ambiente tumoral é mais susceptível do que os tecidos normais para efeitos antiangiogênicos envolvendo a via COX-2/PGE₂. Qualquer que seja o mecanismo predominante *in vivo*, é provável que o Metil Jasmonato torne os vasos tão frágeis e imperfeitos que provoque a destruição tumoral.

Estes resultados nos levaram a supor que os efeitos sobre a angiogênese em ambiente tumoral pudessem ser estudados nos vasos da CAM. Para isto, um novo modelo teve que ser desenvolvido. A tarefa, aparentemente simples, também

dependeu do exercício de refinar modelos anteriores, a partir de descrições da literatura.

O modelo de implante de células neoplásicas sobre a CAM foi adaptado do modelo descrito por Hotta e colaboradores (2006). Este modelo é particularmente interessante porque apresenta resultados rápidos, boa reprodutibilidade e pode ser utilizado para o cultivo de linhagens celulares ou cultura primária de células ou fragmentos de tecidos de diversas espécies, inclusive humanas (CHEN et al., 2007; RIBATTI et al., 2003; SCHECHTMAN et al., 1950; SKAVISNKI et al., 1950). A proposta original do modelo é antiga, foi descrita pela primeira vez por Karnofsky, em 1952, (KARNOFSKY et al., 1952). O modelo foi aprimorado e modificado por diversos autores, até ser utilizado para análise do efeito de quimioterápicos (AUSPRUNK et al., 1975; KNIGHTON et al., 1977; ARMSTRONG et al., 1982; CHAMBERS et al., 1982 ; BROOKS et al., 1994; STAN et al., 1999).

As principais características incluídas na padronização do modelo foram a modificação do local de aplicação das suspensões celulares, as diminuições do inóculo e a forma de documentação a fresco, para o estudo de angiogênese. A cronologia do ensaio de angiogênese foi ligeiramente modificada, para incluir mais uma etapa de manipulação, de semeadura das células de melanoma murino, anterior aos tratamentos com o MeJa.

As células de melanoma murino implantadas diretamente sobre a CAM cresceram pavimentando a membrana de forma a ocupar amplas regiões sobre a superfície, preferencialmente acompanhando a árvore circulatória (figura 74 a 76), mas também formando massas esparsas ou confluentes (Figura 77). Esta linhagem celular já tinha sido utilizada e apresentou excelentes resultados de crescimento e diferenciação sobre as CAM. O crescimento dos melanomas tem a característica de

ocorrer associado a vasos pré-existentes (DANI; ESPINDOLA, 2002). A distribuição irregular e o aspecto das massas observadas neste trabalho já haviam sido descritos por alguns autores (CHAMBERS et al., 1992), que referiram o poder metastático das células de melanoma murino, especialmente em arteríolas. Estudos anteriores também relataram que as células de melanoma murino B16 – F10 migram entre as células endoteliais e invadem o compartimento da circulação, sem que ocorra a destruição da parede dos vasos (De BRUYN; CHO, 1982), como sugere o aspecto da descontinuidade vascular mostrada na figura 75. O crescimento do melanoma sobre a CAM teve um efeito importante de estímulo aos brotamentos vasculares e chegou a aumentar a área de vasos em 20% com relação ao controle. Entretanto, o fato de que o tumor pode ser acompanhado em seu desenvolvimento sobre a CAM, acabou por demonstrar-se um inconveniente no estudo de angiogênese, porque a coloração castanha das massas dificulta a construção precisa das imagens binárias. A fragilidade vascular contribui com a dificuldade, uma vez que a perda de sangue do interior dos vasos diminui o contraste das fotos digitalizadas e, por conseguinte, a medida da angiogênese.

A aplicação de uma dose única de Metil Jasmonato 1 mM diminuiu o número de massas tumorais e a área de distribuição da camada contígua de células de melanoma sobre a CAM (Figura 77). A implantação de células neoplásicas, heterólogas, neste experimento mostrou-se de forma bastante reprodutível. A observação completa da CAM e o isolamento visual das massas tumorais é possível no caso do melanoma por que o tumor apresenta-se pigmentado sobre a CAM. Medidas de extensão das regiões ocupadas ou de prevalência de implantação representam possibilidades reais, mesmo se limitadas, para descrição dos resultados obtidos. Observou-se, de mais relevante, a substituição da camada de

células por um padrão morfológico de células isoladas, distribuídas preferencialmente ao longo dos vasos (figura 77). Estas observações iniciais sugerem um efeito gradual do Metil Jasmonato, em que o padrão do crescimento tumoral foi indistinguível do observado nos tecidos controle na aplicação de doses iguais ou menores a 10 μ M. O modelo tem potencial para estudo de efeitos de outras substâncias sobre a angiogênese em ambiente tumoral, e sobre o crescimento tumoral *in vivo*. Da mesma forma, pode ser adaptado para o estudo da susceptibilidade de linhagens tumorais a substâncias antineoplásicas. Para isto, os cuidados com a fixação do material e o seu processamento bem sucedido até a obtenção de imagens com o contraste resultante da preservação do conteúdo intravascular são essenciais. Obviamente, existem as alternativas do desenvolvimento de técnicas de injeção de contrastes e de coloração, que podem ainda ser exploradas.

A ferramenta para análise quantitativa dos resultados morfológicos sobre a angiogênese precisa ser mais refinada, até permitir a descrição de todos os efeitos observados. As imagens dos vasos nas CAM de animais inoculados com as células neoplásicas mostram um padrão de crescimento vascular aumentado na presença das massas. Este padrão torna-se desorganizado e disfuncional, nos ovos tratados com doses equivalentes às ensaiadas em cultura celular. Ambos os padrões observados são compatíveis com o conjunto de dados anteriores e reiteram a hipótese da analogia funcional entre o Metil Jasmonato e a prostaglandina J₂. Mais estudos serão necessários para o desenvolvimento de ferramentas adequadas para a análise quantitativa desses efeitos. Estima-se que o desenvolvimento de procedimentos padronizados para análise quantitativa do crescimento vascular no modelo de angiogênese resultem em ferramentas importantes para a análise de

angiogênese em ambiente tumoral, neste modelo. Com a vantagem da redução no tempo de experimentação e da substituição dos modelos murinos por um modelo éticamente aceitável, que permite estudar diferentes tipos de tumores.

Finalmente, os efeitos do Metil Jasmonato sobre a angiogênese, descritos neste trabalho, apresentam-se como um novo mecanismo de ação antitumoral desta substância, com a relevância de que as doses que produzem o comprometimento funcional da rede vascular dos tumores são de cem a mil vezes menores do que aquelas que resultam em efeito citotóxico direto sobre as células tumorais, segundo a literatura. Além de um promissor agente antitumoral, o Metil Jasmonato passa a figurar, a partir desses resultados, entre as moléculas com potencial terapêutico como inibidor de angiogênese.

7 Conclusões

Metil Jasmonato foi citotóxico para as células endoteliais humanas de cordão umbilical em cultura em concentrações acima de 1 mM. Para as células de melanoma murino B16 -F10 em cultura, a dose citotóxica observada foi equivalente à observada para as células endoteliais. Este achado confirma a literatura sobre a citotoxicidade do próprio Metil Jasmonato, frente a células tumorais e estende o efeito para as células endoteliais. O mecanismo de citotoxicidade parece envolver apoptose e interrupção do ciclo celular na fase G1, o que sugere uma analogia funcional entre o Metil Jasmonato e as prostaglandinas das classes A e J.

O uso de carreadores lipídicos do tipo lipossomos não modificou a toxicidade do Metil Jasmonato para as células endoteliais, mas permitiu o crescimento das células de melanoma murino em doses em que o composto puro foi citotóxico. Nanocarreadores baseados em açúcar, como o utilizado no A-14 aumentam em 3 ordens de grandeza a toxicidade *in vitro* do Metil Jasmonato para as duas linhagens celulares ensaiadas.

O Metil Jasmonato apresentou efeito anti-angiogênico, *in vivo*, sobre as CAM, que apresentaram uma diminuição na densidade de vasos quando o composto foi aplicado em concentrações maiores do que 1mM, compatível com efeito citotóxico observado nas culturas celulares. Em concentrações da ordem de 1-10 μ M, ocorreu um efeito anti-angiogênico distinto e mais complexo.

Observou-se o aumento na densidade de ramificações dos vasos sanguíneos, provavelmente resultante de estímulo aos brotamentos capilares. Os novos vasos apresentaram-se muito frágeis, com pontos hemorrágicos e menos organizados que

os das CAMs controle. Especula-se que o mecanismo envolva a diminuição na produção de VEGF.

O efeito in vivo do Metil Jasmonato carregado em lipossomos foi equivalente ao observado com o composto puro.

O modelo de angiogênese na CAM foi adaptado para o estudo do efeito do Metil Jasmonato sobre o crescimento tumoral. O crescimento do melanoma murino foi acompanhado pela formação de massas tumorais castanhas ou negras sobre a CAM. O modelo permitiu a aplicação do Metil Jasmonato diretamente sobre a CAM, como nos estudos de morfologia das massas em crescimento ou dissolvido na albumina do próprio ovo, reintroduzida durante a incubação, como nos estudos de viabilidade. Em ambos os casos, evidenciou-se algum efeito protetor do Metil Jasmonato.

O modelo desenvolvido tem potencial para estudo de efeitos de outras substâncias sobre a angiogênese em ambiente tumoral, e sobre o crescimento tumoral in vivo. Da mesma forma, pode ser adaptado para o estudo da susceptibilidade de linhagens tumorais a substâncias antineoplásicas.

Referências

1. ALDRIDGE, D.C.; GALT, S.; GILES, D.; TURNER, W.B. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Chemical Society C**, p.1623-1627, 1971.doi 10.1039/J39710001623.
2. ALITALO, K.; TAMMELA, T.; PETROVA, T.V. Lymphangiogenesis in development and human disease. **Nature** (London), v.438, n.7070, p.946–953, 2005.
3. ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British Journal of Experimental Pathology**, v.68, n.6, p.755-766, 1987.
4. DAVID, C. et al. Angiogenesis protocols – synthesis of glycoproteins by endothelial cells in embryonic blood vessels. **Developmental Biology**, v.90, n. 1, p.79–90, 1982.
5. ARMSTRONG, P.B.; QUIGLEY, J.P.; SIDEBOTTOM, E. Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. **Cancer Research**, v.42, n.5, p.1826-1837, 1982.
6. ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. Endothelial/pericyte interactions. **Circulation Research**, v.97, n.6, p.512–523, 2005.
7. ASPINALL, D.; PALEG, L.G.; ADDICOTT, F.T. Abscisin II and some hormoneregulated plant responses. **Australian Journal of Biological Science**, v.20, p.869-882, 1967.
8. AUGUSTIN, M.C. Antiangiogenic tumor therapy: will it work? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19, n.6, p.216-222, 1998.

9. AUSPRUNK, D.H. Synthesis of glycoproteins by endothelial cells in embryonic blood vessels. **Developmental Biology**, v.90, n.1, p.79–90, 1982.
10. AUSPRUNK, D.H.; KNIGHTON, D.R.; FOLKMAN, J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois: role of host and preexisting graft blood vessels. **American Journal Pathology**, v.79, n.3, p.597-618, 1975.
11. BANAI, S. et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. **Circulation**, v.89, n.5, p.2183-2189, 1994.
12. BENEZRA, D. Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors, and synthetic chemoattractants. **American Journal of Ophthalmology**, v.86, n.4, p.455-461, 1978.
13. BENJAMIN, L.E.; HEMO, I.; KESHET, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. **Development Biology**, Cambridge, United Kingdom, v.125, n.9, p.1591-1598, 1998.
14. BENJAMIN, L.E.; KESHET, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.94, n.16, p.8761-8766, 1997.
15. BERGERS, G. et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature Cell Biology**, v.2, p.737-744, 2000.doi:10.1038/35036374.
16. BISHOP-BAILEY, D.; HLA, T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.24, p.17042-17048, 1999.

17. BLACHER, S. et al. Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). **Image Analysis Stereology**, v.24, p.169-180, 2005.
18. BOUCK, N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. **Cancer Cells**, v.2, n.6, p.179-185, 1990.
19. BROOKS, P.C. et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v.79, n.7, p.1157-1164, 1994.
20. BUCHANAN, F.G. et al. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.37, p.35451-7, 2003.
21. BUCHANAN, F.G. et al. Role of h-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.5, p.1492-1497, 2006.
22. BURKE, P.A.; DeNARDO, S.J. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v.39, n.1-2, p.155-171, 2001.
23. CALLAGY, G. et al. Immunohistochemical measurement of tumorvascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.8, n.2, p.104-109, 2000.
24. CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, New York, v.9, n.6, p.653-660, 2003.
25. CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, New York, v.6, p.389-395, 2000. doi:10.1038/74651.

26. CHAMBERS, A.F.; SHAFIR, R.; LING, V. A model system for studying metastasis using the embryonic chick. **Cancer Research**, v.42, n.10, p.4018-4025, 1982.
27. CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3 a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.21, p.13926-13931, 2002.
28. CHEN, M.J. et al. Suppression of growth and cancer-induced angiogenesis of aggressive human breast cancer cells (MDA-MB-231) on the chorioallantoic membrane of developing chicken embryos by E-peptide of Pro-IGF-I. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.101, n.5, p.1316-1327, 2007.
29. CHINTALGATTU, V. et al. PPAR- γ agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts. **Cardiovascular Research**, v.74, n.1, p.140-150, 2007.
30. CLAFFEY, K.P.; VILKINSON, W.O.; SPIEGELMAN, B.M. Vascular endothelial growth factor: regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n. 23, p.16317-16322, 1992.
31. COLLINS, T.J. et al. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. **EMBO Journal**, v.21, n.7, p.1616-1627, 2002.
32. CONTI, M. A perspective on rational drug design with cyclopentenone: targeting the proteome with the cyclopentenone chemical moiety. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.2, n.9, p.1-7, 2007.
33. CONTI, M. Cyclopentenone: a special moiety for anticancer drug design. **Anticancer Drugs**, v.17, n.9, p.1017-1022, 2006.
34. CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v.49, n.3, p.507-521, 2001.

35. CRABALONA, L. Presence of levorotatory methyl jasmonate, methyl cis-2-(2-penten-1-yl)-3-oxocyclopentenyl acetate, in the essential oil of Tunisian rosemary. **Comptes Rendus Séances de l'Academie des Sciences, Serie C**, v.264, p.2074-2076, 1967.
36. CROSS, B.E.; WEBSTER, G.R. New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part XV. N-Jasmonoyl- and N-dihydrojasmonoyl-isoleucine. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.13, p.1839-1842, 1970.
37. CRUICKSHANK, I.A.; PERRIN, D.R. Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum*. **Nature**, London, v.187, p.799-800, 1960.doi: 10.1038/1877bo.
38. D'AMORE, P.A.; THOMPSON, R.W. Mechanisms of angiogenesis. **Annual Review of Physiology**, v.49, p.453-464, 1987.
39. DANI, S.U.; ESPINDOLA, R. A model system for testing gene vectors using murine tumor cells on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. **Genetic and Molecular Research**, v.1, n. 2, p.167-175, 2002.
40. DAVIS, S. et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell**, v.87, n.7, p.1161-1169, 1996.
41. De GIORGI, F.; LARTIGUE, L.; ICHAS, F. Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. **Cell Calcium**, v.28, n. 5-6, p.365-370, 2000.
42. DE ROSA, J.; VICENTE, E. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane genes using cDNA arrays. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n. 1, p.173-180, 2005.
43. DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MERCIER, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. **Helvetica Chimica Acta**, v.45, n.2, p.675-685, 1962.

44. DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v.89, n.2, p.271-277, 1986.
45. DEVOTO, A. et al. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defense, and hormone interactions. **Plant Molecular Biology**, v.58, n. 4, p.497-513, 2005.
46. DIAZ-RUBIO, E.; SCHMOLL, H.J. The future development of bevacizumab in colorectal cancer. **Oncology**, v.69, p.34-45, 2005. Supplement 3. doi: 10.1159/000088482.
47. DIBNET, J.J.; KNIGHT, C.D.; KITCHELL, M.C. Development of the immune system in neonatal poultry. **Journal Applied Poultry Science**, v. 7, n.4, p.425-36, 1998.
48. DOMINICI, M. et al. Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial colonies growth (CFU-En) and clinical-biological features. **Leukemia**, v.15, n.1, p.171-176, 2001.
49. DUBOIS, R.N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB Journal**, v.12, n.11, p.1063-1073, 1998.
50. EHRMAN, R.L.; KNOTH, M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.41, n.6, p.1329-1341, 1968.
51. EPSTEIN, R.J. VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.26, n. 3-4, p.443-452, 2007.
52. EXPECT WONDERS. The history of aspirin. Disponível em: < www.wonderdrug.com/pain/asp_history.htm>. Acesso em: 16 abril 2009.

53. FANCSI, T.; FEHER, G. Ultrastructural studies of chicken embryo chorioallantoic membrane during incubation. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.8, n. 2, p.151-159, 1979.

54. FARMER, E.E.; RYAN, C.A Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n. 19, p.7713-7716, 1990.

55. FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound - inducible proteinase inhibitor. **Plant Cell**, v.4, n. 2, p.129-134, 1992.

56. FARNSWORTH, N.R. The development of pharmacological and chemical research for application to traditional medicine in developing countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v.2, n.2, p.173-181, 1980.

57. FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**, v.2, n.10, p.795-803, 2002.

58. FERRARA, N.; CLAPP, C.; WEINER, R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. **Endocrinology**, v.129, n. 2, p.896-900, 1991.

59. FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v.18, n.1, p.4-25, 1997.

60. FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine** (New York), v.9, n.6, p.669-676, 2003.

61. FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.161, n.2, p.851-858, 1989.

62. FERRARA, N. et al. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. **Journal of Biological Chemistry**, v.47, n.3, p.211-218, 1991.
63. FERRARA, N.; KERBEL, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, London, v.438, p.967-974, 2005.doi: 10.1038/04483.
64. FINDLEY, C.M.et al. VEGF Induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/akt-dependent pathway to modulate Tie2 signaling. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.27, n.12, p.2619-2626, 2007.
65. FINGRUT, O.; FLESCHER, E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. **Leukemia**, v.16, n.4, p.608-616, 2002.
66. FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **Journal of Medicine**, v.333, n.26, p.1757-1763, 1995. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. New England, 1995.
67. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **Journal of Medicine**, v.285, n. 21, p.1182-1186, 1971.
68. FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ABERNATHY, C.; WILLIAMS, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v.133, n. 2, p.275-288, 1971.
69. FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.246, n.5, p.10931-10934, 1992.
70. FOLKMAN, M.J.; LONG, D.M.; BECKER, F.F. Tumor growth in organ culture. **Surgical Forum**, v.13, p.81-83, 1962.

71. FUNOVICS, P. et al. Effects of 15d-PGJ2 on VEGF-induced angiogenic activities and expression of VEGF receptors in endothelial cells. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v.79, n.3-4, p.230–244, 2006.
72. FURCHT, L.T. Critical factors controlling angiogenesis: Cell products, cell matrix, and growth factors. **Laboratory Investigation**, v.55, n.5, p.505-509, 1986.
73. GASPARINI, G. Prognostic value of vascular endothelial growthfactor in breast cancer. **Oncologist**, v.5, p.37-44, 2000.Supplement 1.
74. GIMBRONE, M.A. et al. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. **Journal of Experimental Medicine**, v.136, n.2, p.261-276, 1972.
75. GLUSKER,P.; RECHT, L.; LANE, B. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and bevacizumab. **New England Journal of Medicine**, v.354, n. 9, p.980-982, 2006.
76. GOLDIN, N. et al. Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the Jasmonate family. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.39, n.1, p.51–57, 2007.
77. GOLDMAN, C.K.et al. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma athophysiology. **Molecular Biology of the Cell**, v.4, n.1, p.121-131, 1993.
78. GOSPODAROWICZ, L.E.; ABRAHAM, J.A.; SCHILLING, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.19, p.7311-7315, 1989.
79. GREENBLATT, M.; SHUBIK, P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique.**Journal of the National Cancer Institute**, v.41, n. 1, p.1111-1124, 1968.

80. GREENE, H.S.N. Heterologues transplantation of mammalian tumors: I the transfer of rabbit tumors to alien species. **Journal of Experimental Medicine**, v.73, n.4, p.461-474, 1941.
81. GREENHOUGH, A.et al. The COX-2/PGE₂ pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v.30, n. 3, p.377-386, 2009.
82. GREILING, D.; CLARK, R.A. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. **Journal of Cell Science**, v.110, n.7, p.861-870, 1997.
83. HARADA, S., J. A. NAGYI, K. A. SULLIVAN, K A. THOMAS, N. ENDO, G. A. RODAN, AND S. B. RODAN. 1994. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, n.6, p.2490-2496, 1994.
84. HARRIS, R.E. et al. Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. **Cancer Research**, v.63, n.18, p.6096-6101, 2003.
85. HILL, R.K.; EDWARDS, A.G. The absolute configuration of methyl jasmonate. **Tetrahedron**, v.21, n.6, p.1501-1507, 1965.
86. HO, T.L. Dihydrojasmonone synthesis - pyrolytic cleavage of a cyclopropyl ketone. **Synthetic Communications**, v.7, n.5, p.351-354, 1977.
87. HOEBEN, A. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacological Reviews**, v.56, n.4, p.549-580, 2004.
88. HOTTA, S.; OHYAMA, A; AOKI, H.C. Cultivation of malignant tumor cells on the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs **Proceedings of the Japan Academy**, v. 35, n.8, p.518-523, 1959.

89. HOUCK, K.A. et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. **Molecular Endocrinology**, v.5, n.12, p.1806-1814, 1991.

90. HU, E.; TONTONAZ, P.; SPIEGELMAN, B.M., Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.21, p.9856–9860, 1995.

91. HUNTER, J.G. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands differentially modulate muscle cell differentiation and MyoD gene expression via peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent and -independent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.41, p.38297-38306, 2001.

92. 104. INSTITUTE FOR IN VITRO SCIENCES (IIVS). **Chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA)**. Disponível em: <<http://www.iivs.org/pages/methods/CAMVAsummarysheet.pdf>>. Acesso em: outubro 2008.

93. ITOH, N.; ORNITZ, D.M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in Genetics**, v.20, n.11, p.563-569, 2004.

94. JAIN, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature Medicine** (New York), v.9, n.6, p.685-693, 2003.

95. JAIN, R.K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.9, n.3, p.253-266, 1991.

96. JIANG, H. et al. Endothelial cell confluence regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ production that modulate motility. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n. 53, p.55905-55913, 2004.

97. KARNOFSKY, D.A.; RIDGWAY, L.P.; PATTERSON, P.A. Tumor transplantation to the chick embryo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.55, n.2, p.313-329, 1952.

98. KAWAMORI, T. et al. Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP1 antagonist, on breast cancer development. **Carcinogenesis**, v.22, n.12, p.2001-2004, 2001.
99. KERBEL, R.S. A cancer therapy resistant to resistance. **Nature** (London), v.390, p.335-336, 1997. doi: 10.1038/36978.
100. KIM, K.J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. **Nature** (London), v.362, n.6423, p.841-844, 1993.
101. KLIONSKY, D.J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, v.4, n.2, p.151-175, 2008.
102. KNIGHTON, D.; AUSPRUNK, D.; TAPPER, D.; FOLKMAN, J. A vascular and vascular phase of tumor growth in the chick embryo. **British Journal of Cancer**, v.35, n.3, p.347-356, 1977.
103. KOLBER, D.L.; KNISELY, T.L.; MAIONE, T.E. Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. **Journal of National Cancer Institute**, v.87, n.4, p. 304-309, 1995.
104. KOTAKA, S.; KRUEGER, A.P. Some observations on the bleaching effect of ethylenediaminetetraacetic acid on green barley leaves. **Plant Physiology**, v.44, n.6, p.809-815, 1969.
105. KUNDU, N.; FULTON, A.M. Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. **Cancer Research**, v.62, n.8, p.2343-2346, 2002.
106. LALA P.K.; PARHAR, R.S.; SINGH, P. Indomethacin therapy abrogates the prostaglandin-mediated suppression of natural killer activity in tumor-bearing mice and prevents tumor metastasis. **Cellular Immunology**, v.99, n.1, p.108-118, 1986.

107. LANE, W.S. et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v.88, n.2, p.277-285, 1997.
108. LEE, A. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 disrupts tumor vascular mural cell recruitment and survival signaling. **Cancer Research**, v.66, p.4378-4384, 2006.
109. LEUNG, D.W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, Washington, D.C., v.246, n.4935, p.1306-1309, 1989.
110. LI, A. et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **Journal of Immunology**, v.170, n.6, p.3369-3376, 2003.
111. LI, J. et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 β in rat aortic smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.1, p.308-312, 1995.
112. LOUB, W.D. et al. Napralert: computer handling of natural product research data. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v.25, n.2, p.99-103, 1985.
113. LUSTER, A.D.; GREENBERG, S.M.; LEDER, P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. **Journal of Experimental Medicine**, v.182, n.1, p.219-231, 1995.
114. MAESHIMA, Y. et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.28, p.21340-21348, 2000.
115. MAISONPIERRE, P.C. et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science**, Washington, D.C., v.277, n.5322, p.55-60, 1997.
116. MAJIMA, M. et al. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in

rat sponge implants. **British Journal of Pharmacology**, v.130, n. 3, p.641-649, 2000.

117. MALINDA, K.M. et al. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. **FASEB Journal**, v.13, n.1, p.53-56, 1999.
118. MARSHALL W. Recent researches on the parasitism of fungi. **Annals of Botany**, Oxford, v.19, p.1-54, 1905.
119. MARSHALL W; A Potato disease. **Annals of Botany**, Oxford, v.12, p561-564, 1898.
120. MARTIN, C.; THIMANN, K.V. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. **Plant Physiology**, v.49, n.1, p.64-71, 1972.
121. MASFERRER, J.L. et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Research**, v.60, n.5, p.1306-1311, 2000.
122. MATHURA, K.R. et al. Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. **Journal of Applied Physiology**, v.91, n.1, p.74-78, 2001
123. MATSUMOTO, H. et al. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.32, p.29260-29267, 2002.
124. McDONALD, D.; CHOYKE, P.L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. **Nature Medicine**, New York, v.9, p.713-725, 2003.doi:10.1038/nm0603.713.
125. MILBORROW, B.V. The identification of (+)-abscisin II [(+)-dormin] in plants and measurement of its concentrations. **Planta**, v.76, p.93-113, 1967.

126. MILBORROW, B.V. The metabolism of abscisic acid. **Journal of Experimental Botany**, v.21, n.1, p.17-29, 1970.
127. MUELLER, M.J. et al. Oxylipin analysis methods. **Plant Journal**, v.45, n.4, p.472-489, 2006.
128. MULLER, M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance and redox considerations. **Antioxidant & Redox Signaling**, v.11, n.1, p.59-98, 2009.
129. MUTOH; M. et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP4 in colon carcinogenesis. **Cancer Research**, v.62, n.1, p.28-32, 2002.
130. O'REILLY, M.S. et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v.79, n.2, p.315–328, 1994.
131. OLIVA, D.; NICOSIA, S.P. PGI2-receptors and molecular mechanisms in platelets and vasculature: state of the art. **Pharmacological Research Communications**, v.19, n.11, p.735-765, 1987.
132. O'REILLY, M.S. et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v.88, n.2, p.277-285, 1997.
133. OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C.A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.11, p.6553-6557, 1999.
134. PAI, R. et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nature Medicine**, New York , v.8, n.3, p.289-293, 2002.

135. PAN, M.R. et al. Cyclooxygenase-2 up regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.17, p.11155-11163, 2008.
136. PARK, J.Y.; PILLINGER, M.H.; ABRAMSON, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v.119, n.3, p.229-240, 2006.
137. PATRIGNANI, P. et al. New insights into COX-2 biology and inhibition. **Brain Research Reviews**, v.48, n.2, p.352-359, 2005.
138. PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase-inhibitor proteins. **Science** Washington, D.C., v.253, n.5022, p.895-898, 1991.
139. PELICANO, H. et al. A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.39, p.37832-37839, 2003.
140. PEREIRA LOPES, E.F. et al. In vivo anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of Methyl-Jasmonate. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, 2009. In press.
141. PERTOVAARA, L. et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.9, p.6271-6274, 1994.
142. PETIT, A.M. et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. **American Journal of Pathology**, v.151, n.6, p.1523-1530, 1997.
143. POSNER, G.H.; ASIRVATHAM, E. A short, asymmetric-synthesis of natural (-)-methyl jasmonate. **Journal of Organic Chemistry**, v.50, n.14, p.2589, 1985.

144. POZZI, A. et al. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.28, p.29797-29804, 2004.
145. RAJKUMAR, S.V. et al. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. **Leukemia**, v.13, n.3, p.469-472, 1999.
146. RASTINEJAD, F.; POLVERINI, P.J.; BOUCK, N.P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. **Cell**, v.56, n.3, p.345-355, 1989.
147. REYNOLDS, L.P.; KILLILEA, S.D.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB Journal**, v.6, n.3, p.886-892, 1992.
148. RIBATTI, D.E et al. In vivo time-course of the angiogenic response induced by multiple myeloma plasma cells in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Journal of Anatomy**, v.203, n.3, p.323-328, 2003.
149. RIBATTI, D. et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. **Anatomical Record**, v.264, n.4, p.317-324, 2001.
150. RIBATTI, D. et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.1, n.1, p.73-82, 2000.
151. RIBATTI, D. et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, v.40, n.6, p.1189-1197, 1996.
152. RICHI.F. Scientists image plant "attack" signaling system: techniques pioneered for medical science shed light on plants' internal communications. **Brookhaven National Laboratory News**, March 16, 2007. Disponível em:<http://www.bnl.gov/bnlweb/pubaf/pr/PR_display.asp?prID=07-29>. Acesso em: janeiro 2009.

153. RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, London, v.386, n.6626, p.671-674, 1997.
154. RISTIMAKI, A. et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Research**, v.62, p.632-635, 2002.
155. ROSENBRUCH, M. Granulation tissue in the chick embryo yolk sac blood vessel system. **Journal of Comparative Pathology**, v.101, n.4, p.363-373, 1989.
156. ROSENBRUCH, M. Toxicity studies of the incubated chicken egg. With special reference to the extra-embryonal vascular systems. **Dermatosen Beruf und Umwelt**, v.38, n.1, p.5-11, 1990.
157. ROSSI, A. et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. **Nature**, London, v.403, n.6765, p.103-108, 2000.
158. ROTEM, R. et al. The anticancer agent methyl jasmonate induces activation of stress-regulated c-Jun N-terminal kinase and p38 protein kinase in human lymphoid cells. **Leukemia**, v.17, n.11, p.2230-2234, 2003.
159. ROTEM, R. et al. Jasmonates: novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. **Cancer Research**, v.65, p.1984-1993, 2005.
160. RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, n.1-2, p.112-121, 2000.
161. SABIA, P.J. et al. An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v.327, n.26, p.1825-1831, 1992.

162. SALCEDO R. et al. Angiogenic effects of prostaglandin E₂ are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. **Blood**, v.102, n.6, p.1966-1977, 2003.
163. SCHECHTMAN, A.M.; COHEN, M.J.; BERKOWITZ, E.C. Culture of brown-pearce carcinoma in the embryonated egg. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.74, n.4, p.784-789, 1950.
164. SCHMELZ, E.A. et al. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.18, p.10552-10557, 2003.
165. SENGER, D. et al. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent cell lines. **Cancer Research**, v.46, p.5629-5632, 1986.
166. SHENG, H. et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. **Cancer Research**, v.58, p.362-366, 1998.
167. SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in Plant Pathology**, v.26, p.135-192, 1997.
168. SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, London, v.359, p.843-845, 1992. doi:10.1038/359843a0.
169. SIBAOKA, H.; THIMANN, K.V. Antagonisms between kinetin and amino acids. **Plant Physiology**, v.46, n.2, p.212-220, 1970.
170. SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v.56, n.3, p.387-437, 2004.

171. SKAVINSKI, E.R.; STEIN, A.M. The effect of tumor implants on chick embryo liver catalase activity. **Cancer Research**, v.10, n.11, p.768-771, 1950.
172. SONDHEIMER, E.; GALSON, E.C.; CHANG, Y.P.; WALTON, D.C. Asymmetry, its importance to the action and metabolism of abscisic acid. **Science**, Washington, D.C., v.174, n.4011, p. 829-831, 1971.
173. STAN, A.C.et al. Antineoplastic efficacy of doxorubicin enzymatically assembled on galactose residues of a monoclonal antibody specific for the carcinoembryonic antigen. **Cancer Research**, v.59, n. 1, p.115-121, 1999.
174. STAVRI, G.T.et al. Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. **FEBS Letters**, v.358, n.3, p.311-315, 1995.
175. STRAUS, D.S.et al. 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.9, p.4844-4849, 2000.
176. SU, J.L.et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. **Cancer Research**, v.64, p.554-564, 2004.
177. SUBBARAMAIAH, K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.15, p.12440-12448, 2001.
178. SWIATEK, A. et al. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology**, v.128, n. 1, p.201-211, 2002.
179. TABRUYN, S.P.; GRIFFIOEN, A.W. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.355, n. 1, p.1-5, 2007.

180. TAKEGAMI, T. A study on senescence in tobacco leaf disks. I. Inhibition by benzylaminopurine of decrease in protein level. **Plant and Cell Physiology**, v.16, n. 3, p.407-416, 1975.
181. THIMANN, K.V.; SATLER, S.O. Relation between leaf senescence and stomatal closure: Senescence in light. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76, n.5, p.2295-2298, 1979.
182. THURSTON, G. et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. **Science**, Washington, D.C., v.286, n.5449, p.2511-2514, 1999.
183. TIMOSHENKO, A.V. et al. Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. **Experimental Cell Research**, v.289, n. 2, p.265-274, 2003.
184. TUDER, R.; VOELKEL, N. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in primary pulmonary hypertension. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.18A, p.330, 1994.
185. TUDER, R.M.; FLOOK, B.E.; VOELKEL, N.F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia: modulation of gene expression by nitric oxide. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, n. 4, p.1798-1907, 1995.
186. UEDA, J.; KATO, J. Isolation and Identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.) **Plant Physiology**, v.66, n.2, p.246-249, 1980.
187. VACCA, A. et al. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non- Hodgkin's lymphomas. **British Journal of Cancer**, v.79, n.5-6, p.965-970, 1999.

188. VAN DER SCHAFT, D.W.et al. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells. **Blood**, v.96, n.1, p.176-181, 2000.
189. VAUPEL, P.; THEWS, O.; HOECKEL, M. Treatment resistance of solid tumors: Role of hypoxia and anemia. **Medical Oncology**, v.18, n.4, 243-259, 2001.
190. VICK, B.A.; ZIMMERMAN, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. **Plant Physiology**, v.75, p.458-461, 1984.
191. VORAVUD, N.; CHARURUK, N. Tumor angiogenesis. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v.82, n.4, p.394-404, 1999.
192. VOSSELER, C.A.; WEBER, P.C. Structural requirements of cyclopentenone prostaglandins to induce endothelial cell apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.307, n.2, p.322-326, 2003.
193. WALKER-SIMMONS, M.; RYAN, C.A. Wound-induced peptidase activity in tomato leaves. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.74, n.2, p.411-416, 1977.
194. WANG, D.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.2, p.415-416, 2004.
195. WASTERACK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, v.100, n.4, p.681-697, 2007.
196. WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **American Journal of Pathology**, v.147, n.1, p.9-19, 1995.
197. WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v.324, n.1, p.1-8, 1991.

198. WEST, D.C. et al. Angiogenesis assays using chick chorioallantoic membrane. In: MURRAY, J.C., ed. **Angiogenesis protocols**. Totowa, Humana Press, 2001. p.107-129. (Methods in Molecular Medicine, v.46).

199. YAMASHITA, J. et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. **Nature**, London, v.408, n.6808, p.92-96, 2000.

200. YOON, J.C. et al. peroxisome proliferator-activated receptor γ target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, p.5343-5349, 2000.

201. YU, J.L. et al. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. **Science**, Washington, D.C., v.295, p.1526-1528, 2002.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 26 /2008

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeito de metildihidroxi jasmonato sobre o crescimento tumoral e a angiogênese em modelos experimentais ‘in vitro’ e ‘in vivo’: estudo de formulação em nanopartículas lipídicas” (Protocolo CEEA nº182), de responsabilidade do pesquisador José Emílio Fehr Pereira Lopes sob a supervisão da Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes, 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 em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 12/05/2008.

São Paulo, 12 de maio de 2008.

Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Vice-Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3877 / Fax: (11) 3813-5063 - e-mail: rtrigo@usp.br

José Emílio Fehr Pereira Lopes

Anexo A

PEREIRA LOPES, E.F. et al. In vivo anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of Methyl-Jasmonate. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, 2009. In press.

PEREIRA LOPES, E.F. et al. In vivo anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of Methyl-Jasmonate. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, 2009. In press.

TITLE:

***In vivo* anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of Methyl Jasmonate**

Pereira Lopes EF¹, Barbosa MR¹, Stella CN¹, Santos WA¹, Pereira EM¹, Nogueira-Neto, J², Augusto, EM¹, Silva, LV¹, Smaili, SS³, Gomes LF^{1*}

INSTITUTIONS:

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP) Brazil; ² Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil and ³ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil.

Abstract

Molecular plant components have long been aimed at the angiogenesis and anti-angiogenesis pathways, and have been tested as sources for antineoplastic drugs with promising success. The present work deals with the anti-angiogenic effects of Methyl Jasmonate. The Jasmonate derivatives were demonstrated to selectively damage the mitochondria of cancer cells. *In vitro*, 1-10 mM Methyl Jasmonate induced the cell death of the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the Murine melanoma cells (B16F10), while micromolar concentrations were ineffective. *In vivo*, comparable concentrations were toxic and reduced the vessel density of the Chorioallantoic Membrane of the Chicken Embryo (CAM). However, 1-10 μ M concentrations produced a complex effect. There was increased capillary budding, but the new vessels were leakier and less organized than corresponding controls. It is suggested that not only direct toxicity, but also the drug effects upon angiogenesis are relevant to the antineoplastic effects of Methyl Jasmonate.

Keywords: Methyl Jasmonate, antiangiogenesis, CAM model, endothelial cell culture, HUVEC

Resumo:

Moléculas de origem vegetal são há muito conhecidas como substâncias ativas sobre as vias de angiogênese e anti-angiogênese e foram testadas como fonte de drogas antineoplásicas com sucesso promissor. Este trabalho trata dos efeitos antiangiogênicos do Metiljasmonato, um protótipo da família dos derivados do ácido jasmônico, que danificam seletivamente a mitocôndria de células neoplásicas. *In vitro*, metiljasmonato 1-10 mM promoveu a morte celular de células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC) e de melanoma murino (B16F10), concentrações micromolares foram inócuas. *In vivo*, concentrações equivalentes foram tóxicas, e reduziram a densidade de vasos em membranas corioalantóicas de embrião de galinha (CAM). Entretanto, concentrações entre 1-10 μ M

produziram um efeito complexo. Ocorreu aumento no brotamento capilar, mas os novos vasos apresentaram-se frágeis e menos organizados que os controles correspondentes. Sugere-se que além da toxicidade direta contra as células tumorais, a ação do metiljasmonato sobre a angiogênese seja relevante para seu efeito antineoplásico.

Palavras-Chave: Metiljasmonato, anti-angiogênese, modelo da CAM, cultura de células endoteliais, HUVEC

Introduction

The Jasmonate derivatives are recognized as cytotoxic substances against tumor cells that induce apoptosis in malignant cells through different pathways, while the corresponding normal cell types were resistant, highlighting the therapeutic potential of these molecules as antineoplastic substances. (Fingrut and Flescher, 2002). The mitochondrial membrane is the likely target for the p53-independent Jasmonates cytotoxicity (Rotem et al., 2005). Other targets were considered, taking into account the structural similarities between Jasmonate derivatives and prostaglandins (Conti et al., 2007). Remarkably, endothelial cell lineages were never tested for Jasmonates toxicity, despite its known susceptibility to apoptosis. Endothelial and tumor cells share mitochondrial structural and functional peculiarities that prompted us to hypothesize that both cell types could present analogous susceptibility to Jasmonates. Indeed, both cell types present anaerobic metabolism dependence (Gatenby, R. A.; Gillies, 2004) and higher mitochondrial heterogeneity than most of the other cell types (Colins et al., 2002; De Giorgi et al, 2000). Indeed, Methyl Jasmonate was now found to be an anti-angiogenic compound both in Endothelial Cell cultures *in vitro* and in the model of angiogenesis in Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane *in vivo*. Altogether, the well-known cytotoxicity of Methyl Jasmonate against cancer cells and its *in vivo* anti-angiogenic action, adjudicate its use for therapeutic purposes.

Materials and methods

Preparation of Methyl Jasmonate:

The commercial methyl (1R, 2R)-3-Oxo-2-(2Z)-2-pentenyl-cyclopentanoacetate (Methyl dihydrojasmonate 96% *cis-trans* mixture Sigma Aldrich - Missouri - USA) was diluted in absolute ethanol (Merck). It was analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) in a Focus chromatograph coupled to a PolarisQ mass spectrometer equipped with automatic injector and ion trap TriPlus, as described (Mueller et al, 2006).

Samples (1 μ L) were splitless mode injected at 250 °C, under 0.6 ml/min He flow. Each chromatogram was initiated at 100 °C, for 1 min, then temperature was increased 10 °C/min until 300 °C, and kept constant for 4 min. Transfer line and detector were at 250 and 200 °C, respectively. Full scan - m / z: 50-400 Mass spectrum was obtained and compared with literature (Schmelz et al., 2003, Mueller et al, 2006). The compound was employed either purely or dissolved in ethanol for all the biological assays.

In vitro toxicity and endothelial cell cultures

Human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were grown 5×10^4 cells / ml in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum in 96 wells plates. Adherence was obtained after 3-6h at 37 ° C / 5% CO₂. **MTT test** was performed as described (Denizot and Lang, 1986, modified). Briefly, adhered cells were exposed to Methyl Jasmonate in serum free RPMI for 24h. After this time, the medium was removed through soaking and then each well was added with 50 μ L of MTT (1mg/ml) in phenol red free RPMI. The plates were shaken for 3h and the medium was removed by inversion. MTT Formazan was dissolved through swirling with 100 μ L of DMSO for 30 min and measured in spectrophotometric ELISA reader at 580 nm. Controls were processed as samples, excluding the Methyl Jasmonate. **Growth curves** were followed for 96h after adhered cells were exposed to Methyl Jasmonate in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum. After trypsinization and quantitative suspension of each individual well content in an isotonic solution of Trypan Blue, viable cells were counted twice in a 0.4 mm³, using a Neubauer chamber. Individual data points were obtained as a mean of independent triplicates, at 24 h intervals. **VEGF production** was analyzed in the cell culture supernatants after 4h exposition to known concentrations of Methyl Jasmonate with the commercial ELISA kit (R&D System, Minneapolis, Mn, USA, cat n. DY293B). Cell death was evaluated by cell cycle analyzes performed using Flow Cytometry (FACScalibur, BD, USA). In this case cells were used after 18h exposition and incubation with propidium

iodide. To estimate the possible involvement of cell death *versus* autophagy, cells were incubated with Acridine Orange and analyzed by Flow Cytometry as well (Klionsky et al, 2008).

In vivo angiogenesis assay (CAM model)

The effect of Methyl Jasmonate on angiogenesis was studied in the incubated eggs lying on a hatching tray, as described (Ribatti et al, 1996; 2000). Recent 24 h postured eggs of 18 m old Gallus Domesticus, white and weighing approximately 45 g, were incubated in a brooder (Zagas - São Paulo-SP) at 51% internal humidity and 37.2 ° C. After 5 days of incubation, the eggs were taken to a lamellar flow camera and 5mL of albumin were removed through a small hole produced in the air chamber, with a 27x5 mm disposable needle coupled to a 5 ml sterile syringe. The left needle's hole, at the external egg shell air chamber, was sealed with a piece of sterile tape. After this procedure, a piece of approximately 2 cm² of the egg shell was carefully removed in order to provide an observation window in the upper face of the egg. After confirmation of the existence and viability of the embryo, the window was sealed with transparent sterile tape, avoiding external contact. The incubation was continued for another 120 h, and was inspected each day with the development and viability of the embryo. At the end of this period, the tape was again opened at the lamellar flow camera and a circular filter, sterile, 5 mm in diameter was deposited on the outside of the yolk sac. This filter serves as a support for the application of different doses of Methyl Jasmonate, The collection of the material occurred after the sacrifice of the embryo by hypothermia and further fixation with the use formalin for a 20 min period. The CAM was then cut around the disc or the site of application and washed with phosphate-buffered saline isosmotic ice, placed, well distended, between slide and coverslip and photographed with the program ACT-2U by a digital DS-U1 camera attached to a stereoscopic Nikon SMZ1800 microscope at 2 x magnification, standardized illumination, shadow regulation and TIFF image resolution. The

images were analyzed for vessel densities with the program Image J. Results were expressed in the number of pixels of the images obtained after preset threshold binary conversion (Areas).

Results

MeJa consistently impaired vascular growth in this Chorioallantoic model of angiogenesis, but its effects seemed to occur through at least two different mechanisms depending on the applied dosage. Lower concentrations typically ($<100\ \mu\text{M}$ MeJa) resulted in disordered vascular growth, forming lots of capillary anastomosis and dysfunctional vessels, compatible with VEGF withdrawing. On the other hand, milimolar concentrations significantly reduced the capillary growth, an effect which is most likely associated with direct cytotoxicity. (Figure 1). In order to better understand the *in vivo* observed effect, cell culture effects were characterized. Both the classical endothelial cell lineage, HUVEC, and a MeJa susceptible neoplastic cell lineage, B16F10 murine melanoma, were studied. Melanoma cells and HUVECs presented similar susceptibility to MeJa cytotoxic effects in the MTT test (Figure 2). Toxic concentrations were in the 1-10mM range for both cells. Less confluent cultures exposed to 1-10 μM MeJa consistently produced higher MTT reduction than corresponding controls (not shown). However growth curves failed to demonstrate increased cell proliferation, despite cytotoxicity was unequivocally shown at 1-10mM MeJa (Figure 2).

Flow Cytometry studies confirmed HUVECs' apoptotic cell death with 10 mM MeJa, while 1mM MeJa induced cell cycle G_1 arrest, as shown in Table 1. In endothelial cells and at micromolar concentrations, MeJa also induced early effects such as morphological changes (multinucleation, microvacuolation, cell shrinkage and apoptotic bodies), and metabolic changes, revealed through combined Acridine Orange/Propidium Iodide probing and decreased VEGF production (Table 1).

Discussion

Our results demonstrated, for the first time, to our knowledge, the influence of MeJa in angiogenic development *in vivo*, demonstrating its potential as therapeutic option for cancer treatment.

Noteworthy, the functional proximity among MeJa and cyclopentenone prostaglandins was addressed by Conti (Conti, 2006). These compounds share with MeJa the ability to induce cancer cell cycle G1 arrest at concentrations slightly lower than those employed to promote overt cell death (Hsiang and Straus, 2002). Also, the 2-cyclopentenone ring itself was reported to be pro-apoptotic to HUVECs at concentrations as low as 0.25 μ M (Vosseler and Weber, 2003).

Indeed, the cell cycle G1 arrest and death induction of normal endothelial cells from the HUVEC lineage as reported in Table 1, also leads us to consider similar targets, despite MeJa lack of the minimal cyclopentenone structure (Vosseler and Weber, 2003). The putative cytotoxicity mechanisms of the cyclopentenone prostaglandins are NF κ B activation blockage and PPAR γ activation (Bishop-Bailey and Hla, 1999; Straus et al, 2000; Rossi et al., 2000). Both pathways are known to be relevant for the control of vascular growth and differentiation *in vivo*, as the transcription signals promote VEGF and other growth factors expression. In miofibroblasts, the activation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ by its agonists induces VEGF expression while simultaneously decreasing inflammation (NF-KB) (Chintalgattu et al, 2007). VEGFR2 expression is an additional target of PPAR activation in endothelial cells. In HUVECs, an anti-angiogenic effect was reported for PGJ₂, a PPAR agonist which simultaneously produces a moderate VEGF increase and a transient and self-limited VEGFR2 decrease (Funovics et al., 2006). It is important to mention that these mechanisms synergize, but are not necessarily interdependent. On the other hand, the mitochondria proved to be the main target to MeJa induced cell death (Rotem et al, 2005;

Goldin et al., 2007). Nonetheless, despite HUVECs and B16F10 melanoma cells presented similar susceptibility to the toxic milimolar doses of MeJa, as both cell types were unaffected by lower MeJa doses (Figure 2), VEGF production showed a discrete 20% increase at 4h exposition (Table 1) and this probably represents an early and transient survival signal.

It is speculated if VEGF increases and VEGFR2 transient decreases, they could play a role in vascular leakiness. Vascular permeability is controlled by VEGF and angiopoietins which bind to a tyrosine kinase receptor. Increased VEGF promotes receptor cleavage and inhibits vascular stabilization mediated by angiopoietin-1 (Thurston et al, 1999; Findley et al, 2007). On the other hand, VEGF withdrawn in the presence of Angiopoietin-2 results in low vessel maturation, increased proliferation and leakiness.

In accordance with previously reported effects of the cyclopentenone prostaglandins (Funovics et al., 2006), *in vivo* effects were surprisingly intense, not only at the toxic milimolar doses, but also in micromolar concentration ranges. Convergent, but distinct effects, were seen in milimolar and micromolar concentrations of MeJa. Higher doses impacted vessel growth, resulting in lower densities, probably after gross energy metabolism impairment and increased cell death (Figure 1) following the transient stimulation of VEGF production. On the other hand, an *in vivo* increased and disordered proliferation associated to dysfunctional vessels in the CAMs exposed to lower doses (Figure 1). This effect is probably dependent on more complex signal transduction. We could not find important cell cycle effects upon HUVEC cells in this concentration range, except for a discrete increase of the Acridine Orange labeling at 10 μ M (Table 1), which may indicate one attempt of the cells to survive by stimulation of some autophagy. Conversely, with the increase in concentration, autophagy would not be present and apoptotic cell death would occur. Redox imbalance are surely involved in cell senescence mechanism (Muller, 2009), however the results presented

in Table 1 only allow us to consider senescence induction among the possibilities of MeJa cytotoxicity towards endothelial cells at millimolar, but not at micromolar concentration range.

Decreased *in vitro* VEGF production was observed at micromolar doses, which is compatible with the pattern of vascular impairment observed *in vivo*. Similar effects of VEGF withdrawn were described in tumors and in the uterine epithelium (Benjamin and Keshet, 1997, Matsumoto et al, 2002). VEGF withdrawn effects of MeJa can derive from the suppression of COX-2 transcription through either AP-1 dependent and independent mechanisms (Subbaramaiah et al, 2000). Several of the known anti-neoplastic properties of PGJ₂ and PPAR γ ligands rely on their ability to inhibit COX-2 expression and PG biosynthesis (Simmons et al, 2004). COX-2 inhibition is particularly important in the neoplastic, as well as in the embryonic microenvironment. COX-2 expression is driven by shear stress and hypoxia and is much less relevant in normal than in rapid growing and inflamed or regenerating tissues (Greenhough et al, 2009). The COX-2/PGE₂ pathway have multiple pro-angiogenic effects. PGE₂ can enhance the hypoxia induced factor-dependent expression of VEGF-A, and also the expression of other VEGFs and chemokine receptors acting upon microvessel assembly (Su et al 2004, Pan et al, 2008) . The COX-2 expression and the consequent PGE₂ production are higher in the migrating cells of developing sprouts than in the confluent endothelial monolayer of mature vessels. In the actively growing tumor vessels, PGE₂ acts as an autocrine signal for vascular sprouting (Jiang et al, 2004). The inhibition of the COX-2/PGE₂ pathway is therefore expected to constrain the production of functional neovessels inside tumors. Moreover, there are other relevant mechanisms implied in vasculature impairment and leakage. Some of them can only be disclosed in complex models and not in the monotype cell cultures, as they stand for the endothelial cells, pericytes, and smooth muscle cells interactions (Lee et al, 2006). PGJ₂ was reported to promote adipose conversion in a variety of cell lines, to block myogenesis through inhibition of Myo D gene

expression, and to induce the PPAR γ angiopoietin related (PGAR) protein expression in endothelial cells (Hu et al, 1995, Hunter et al, 2001, Salcedo et al, 2003). This close angiopoietin-2 related protein is particularly present in placental tissues and responds for vascular remodeling (Yoon et al, 2000). Whichever the mechanism predominates *in vivo*, it is proposed that MeJa can turn the neovessels so leaky as to cause tumor destruction.

Critical imbalance effects of a myriad of pro- and anti-angiogenic growth factors were obviously favored within the extra-embryonic egg tissue model. Outstandingly, presented results disclose the synergistic and multitargeted actions of MeJa. In conclusion, mechanistic insight was provided through paired endothelial cell cultures and *in vivo* assays. The converging *in vivo* anti-angiogenic actions adds to the promising therapeutic application of Methyl Jasmonate as an antineoplastic substance.

Acknowledgments

The authors specially thank Dr. Eliezer Flescher from the Tel-Aviv University for his helpful advisory support, Dr. Irene Yan for allowing us to use the stereoscopic microscope and for kindly managing the egg purchase and distribution among several research groups, Ms. Priscila di Napoli from the CINTERGEN – UNIFESP for analyzing the VEGF samples, Ms. Moema Rodrigues dos Santos for the help with the references formats, and Ms. Marina Barbosa Pereira Lopes from the Boston College for reviewing the manuscripts. Dr. Ligia Gomes is granted by FAPESP (07/57728-5). Present work was partially supported by FUNAMA.

References

1. BENJAMIN, LE. and KESHET, E., 1997. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 94, p.8761-8766.
2. BISHOP-BAILEY, D. and HLA, T., 1999. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- Δ^{12} , 14-prostaglandin J₂. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, p. 17042-17048.
3. CHINTALGATTU, V., HARRIS, GS., AKULA, SM., KATWA, LC., 2007. PPAR- γ agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts. *Cardiovascular Research*, vol. 74, no. 1, p. 140-150.
4. COLLINS, TJ., BERRIDGE, MJ., LIPP, P. and BOOTMAN, MD., 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO Journal*, vol. 21, p. 1616-1627.
5. CONTI, M, 2006. Cyclopentenone: a special moiety for anticancer drug design. *Anticancer Drugs*, vol. 17, p. 1017-1022.
6. CONTI, M., 2007. A perspective on rational drug design with cyclopentenone: targeting the proteome with the cyclopentenone chemical moiety. *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 2, no. 9, p. 1-7.
7. De GIORGI, F., LARTIGUE, L., ICHAS, F., 2000. Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. *Cell Calcium*, vol. 28, p. 365-370.
8. DENIZOT, F. and LANG, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, vol. 89, p. 271-277.

9. FINDLEY, CM., CUDMORE, MJ., AHMED, A., KONTOS, CD., 2007. VEGF Induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/akt-dependent pathway to modulate Tie2 signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 27, p. 2619-2626.
10. FINGRUT, O. and FLESCHER, E., 2002. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia*, vol. 16, p. 608–616.
11. FUNOVICS, P., BROSTJAN, C., NIGISCH, A., FILA, A., GROCHOT, A., MLECZKO, K., WAS, H., WEIGEL, G., DULAK, J., JOZKOWICZ, A., 2006. Effects of 15d-PGJ2 on VEGF-induced angiogenic activities and expression of VEGF receptors in endothelial cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, vol. 79, no. 3-4, p. 230–244.
12. GATENBY, RA. and GILLIES, RJ., 2004. Why do cancer have a high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, p. 891–899.
13. GOLDIN, N., HEYFETS, A., REISCHER, D., FLESCHER, E., 2007. Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the Jasmonate family. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 39, p. 51–57.
14. GREENHOUGH, A., SMARTT, HJM., MOORE, AE., ROBERTS, HR., WILLIAMS, AC., PARASKEVA, C., KAIDI, A., 2009. The COX-2/PGE₂ pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, vol. 30, p. 377-386.
15. HU, E., TONTONNOZ, P., SPIEGELMAN, BM., 1995. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 92, p. 9856–9860.

16. HUNTER, JG., van DELFT, MF., RACHUBINSKI, RA., CAPONE, JP., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands differentially modulate muscle cell differentiation and MyoD gene expression via peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent and -independent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, p. 38297-38306.
17. JIANG, H., WEYRICH, AS., ZIMMERMAN, GA., McINTYRE, TM., 2004. Endothelial cell confluence regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E_2 production that modulate motility. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, p.55905-55913.
18. KLIONSKY DJ., ABELIOVICH, H., AGOSTINIS, P., AGRAWAL, DK., ALIEV, G., ASKEW, DS., BABA, M., BAEHRECKE, EH., BAHR, BA., BALLABIO, A., BAMBER, BA. et al. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, vol. 4, no. 2, p. 151-175.
19. LEE, A., FRISCHER, J., SERUR, A., HUANG, J., BAE, JO., KORNFIELD, ZN., ELJUGA, L., SHAWBER, CJ., FEIRT, N., MANSUKHANI, M., STEMPAK,D., BARUCHEL, S., BENDER, JG., KANDEL, JJ., YAMASHIRO, DJ., 2006. Inhibition of cyclooxygenase-2 disrupts tumor vascular mural cell recruitment and survival signaling. *Cancer Research*, vol. 66, p. 4378-4384.
20. MATSUMOTO, H., MA, W., DAIKOKU, T., ZHAO, X., PARIA, BC., DAS, SK., TRZASKOS, JM., DEY, SK., 2002. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, p. 29260-29267.
21. MUELLER, MJ., MÈNE-SAFFRANE, L., GRUN, C., KARG, K., FARMER, EE., 2006. Oxylin analysis methods. *Plant Journal*, vol. 45, p. 472–489.

22. MULLER, M., 2009. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance and redox considerations. *Antioxidant & Redox Signaling* vol.11, no.1, p.59-98.
23. PAN, MR., HOU, MF., CHANG, HC., HUNG, WC., 2008. Cyclooxygenase-2 up regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, p. 11155-11163.
24. RIBATTI, D., VACCA, A., RONCALI, L., DAMMACCO, F., 1996. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, vol. 40, p. 1189–1197.
25. RIBATTI, D., VACCA, A., RONCALI, L., DAMMACCO, F., 2000. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 1, p. 73-82.
26. ROSSI, A., KAPAHI, P., NATOLI, G., TAKAHASHI, T., CHEN, Y., KARIN, M., SANTORO, MG., 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature (London)*, vol. 403, p. 103-108.
27. ROTEM, R., HEYFETS, A., FINGRUT, O., BLICKSTEIN, D., SHAKLAI, M., FLESCHER, E., 2005. Jasmonates: novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. *Cancer Research*, vol. 65, p. 1984-1993.
28. SALCEDO R., ZHANG, X., YOUNG, HA., MICHAEL, N., WASSERMAN, K., MA, WH., MARTINS-GREEN, M., MURPHY, WJ., OPPENHEIM, JJ., 2003. Angiogenic effects of prostaglandin E₂ are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, vol. 102, p. 1966–1977.
29. SU, JL., SHIH, JY., YEN, ML., JENG, YM., CHANG, CC. HSIEH, CY., WEI, LH., YANG, PC., KUO, ML. 2004. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-

- dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Research*, vol. 64, p. 554-564.
30. SUBBARAMAIAH, K., LIN, DT., HART, JC., DANNENBERG, AJ., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, p. 12440-12448.
 31. SCHMELZ, EA., ENGELBERTH, J., ALBORN, HT., O'DONNELL, P., SAMMONS, M., TOSHIMA, H., TUMLINSON III, JH., 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 100, p. 10552-10557.
 32. SIMMONS, DL., BOTTING, RM., HLA,T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of Prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*, vol. 56, p. 387-437.
 33. STRAUS, DS., PASCUAL, G., LI, M., WELCH, JS., RICOTE, M., HISIANG, C., SENGCHANHALANGSY, LL., GHOSH, G., GLASS, CK. 2000. 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 97, p. 4844-4849.
 34. THURSTON, G., SURI, C., SMITH, K., McCLAIN, J., SATO, TN., YANCOPOULOS, GD., McDONALD, DM., 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science (Washington)*, vol. 286, no. 5449, p. 2511–2514.
 35. VOSSELER, CA., WEBER, PC., 2003. Structural requirements of cyclopentenone prostaglandins to induce endothelial cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 307, p. 322-326.

36. YOON, JC., CHICKERING, TW., ROSEN, ED., DUSSAULT, B., QIN, Y., SOUKAS, A., FRIEDMAN, JM., HOLMES, WE., SPIEGELMAN, BM., 2000. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ target gene encoding a novel Angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, p. 5343-5349.

Table 1 – Cell Cycle and metabolic effects of MeJa upon HUVEC cells

	Cell cycle profile, 18h			Acridine orange	VEGF (pg/mL)
	Dead cells %	G0/G1, %	G2/S, %	labelled cells, %	2.10 ⁶ cells, 4h
untreated	6	59	35	6,3 ± 0,1%	431 ± 67
10mM	93	5	2	n.d. ^a	n.d. ^a
1mM	13	72	15	6,2 ± 0,1%	566 ± 31
100µM	8	56	36	6,7± 0,3%	450 ± 30
10µM	7	60	33	9,0 ± 0,5%	319 ± 12 ^b

^a n.d. – not determined. Data point interpretation precluded due to extensive cell death. (n=3)

^b (Control x 10µM treated, p<0,05).

Figure 1 -

Figure 2

Legends

Figure 1 – Typical aspects of the MeJa *in vivo* effects upon the angiogenesis within the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane. Unexposed control and log-based series of MeJa exposed membranes as exemplified, with the corresponding concentration in the upper corner of each image. Lower right panel shows the measured mean $\pm$ standard deviation vessel areas for independent samples, ($n \geq 3$), measured after binarization of the digital images as described in Materials and Methods. Results were plotted as pixel densities in relation to molar concentrations of MeJa, in a linear x log format. Image size: 1280*960 pixels. Optical magnification: 2x.

Figure 2 – MeJa citotoxicity for HUVEC ($\square$ ■, left panels) and B16F10 ($\circ$ ●right panels) cells measured through MTT reduction test, after 24h exposition (open symbols) or expressed as log phase doubling times, in 5 days cultures (closed symbols).

Anexo B

DEDICAÇÃO ESPECIAL IN MEMORIUM

Homenagem

Ao Felipe.

Peço licença a todos os adultos, e permito-me em fazer esta mensagem a um primo que ainda é pequeno para entendê-la. Ou talvez, ele seja de tal grandeza que meus olhos adultos, já subtraídos de qualquer inocência, não consigam ver. Quero lhe contar uma história sobre os olhos mais bonitos que um dia existiram! A força dessa luz era tanta a ponto das estrelas terem copiado para elas, o tom dos seus brilhos. As minhas memórias são iluminadas por estes faróis turquesa iluminando a minha estrada. Na mente desse que te escreve, está a luta e fibra que compunham a dona desses fachos incandescentes. Os olhos eram a porta de entrada, a mente não menos brilhante dessa grande mulher. Neste final de trabalho, nasceu uma tese de doutorado. E neste ponto que peço permissão de falar de mim, e de uma paixão de irmão, que transcende e difere do seu sentimento, posto que seja filho. Contudo, estes sentimentos se confluem a um só e tão somente. Na minha vida, mesmo quando cansado ou deixado me levar pelo desânimo, vejo que tenho que continuar a estudar na busca de um alívio, para aqueles que sofrem de uma doença, que você quando crescido, Oxalá, não ouvirá mais o que isto vem a ser! Se as palavras se fazem difíceis, hoje, para você, amanhã estas linhas chegarão a suas mãos, e tenho certeza que irá entendê-las.

Acho que de alguma forma, esta carta eletrônica deveria se chamar prece de um cientista. Explico-lhe o porquê. Estudo arduamente, na busca de um elixir, que acredito eu, que o mesmo Graal é procurado por muitos, em todos os cantos do mundo, se é que há cantos, nesta esfera elíptica, chamada terra. O que procuramos chama-se: a cura do câncer. Foram muitos anos e luta para que este trabalho sobre ensaios de novas possibilidades de tratamento dessa doença pudesse ser futuramente projetado. A fome de bater este mal é tanta, que minha mente não permite que eu durma ou até mesmo sonhe, mantendo-me ativo, com esforço físico, o qual se nega a me dar no fim do dia, um devido descanso. Vejo-me, na frenética e louca aventura, de correr contra o tempo. São muitas pessoas que sofrem de um mal covarde, que se esconde no silêncio. Estas pessoas Felipe, nos perguntam onde e quando virá a cura para aliviar muitos que sofrem. Infelizmente, a doença não permite que a descoberta seja assim. São achados, grandes ou pequenos, que se juntam para compor um tratamento, e não uma pílula que vem como dádiva embrulhada na esperança da cura. Mas temos que prosseguir e não podemos parar.

O que escrevemos hoje, neste trabalho, poderá fazer parte de um complexo multidisciplinar que poderá promover futuramente o alívio. Acredite o prazer de servir a todas estas pessoas doentes é grande, mas não me atrevo a dizer que o mesmo sentimento seja maior daquele o que os recebe. É amar sem a necessidade de ser amado. Alguns dizem que é um sentimento injusto, pôr ser aceitável a solidão que os estudos nos conferem, consumindo as horas que se vão, noite adentro, e o corpo nos alerta que temos que descansar, pois já se fazem cedo as primeiras horas matinais, do próximo dia.

Amanhecer em laboratórios foge do romantismo do amanhecer descrito nas bucólicas fantasias românticas. Mas não há tédio. Existe uma euforia, que bate o marasmo e o faz breve em esquecê-lo.

Mas é necessário que primeiro você ame a vida, como essa pessoa que me inspira na minha memória, amou! Você tem que ser movido por uma força que dificilmente pode ser classificada. Por isto, cientistas verdadeiros são chamados de loucos. São loucos pela vida, por este fragmento restrito que a nós é conferido, para aprender o pouco, ainda, mas o muito que a ciência nos dá. São tantas coisas que correm na mente, que a boca não acompanha o movimento de idéias e incertezas, causando muitas vezes nesta hora uma dificuldade na comunicação. A ciência é um riacho que deságua no mar da humanidade, no imenso desconhecido.

Mas amando o que faço, me sinto vivo. Acredito no que procuro, mas não tenho em meus braços. Tal como você, em todos os seus dias, seja onde o amor estiver o farão amado. E que se não for merecido, a vida te fará de longe, tudo esquecer. Pois, com a fibra da qual você foi construído, esqueça a mágoa que possa ocupar seu coração um dia, ela não será e nem pode ser guardada.

Espero a experiência me servir como cálice para brindar o êxito que há de vir. Vejo pessoas, amigos, familiares e tantos outros, não poderem mais esperar, e serem embarcados os seus derradeiros destinos, me deixando com o cálice levantado ao alto, muitas vezes, defrontando um pacto honroso com a solidão. Não posso curá-los! Mas se mesmo não declinar tal delírio, que eu saiba ser persistente sem desesperar.

Mesmo quando chegam batalhões de infiéis questionando e abatendo suas recentes conquistas, temos que ser fortes para entender que esta é a arma dos que nada fizeram nesta vida. Temos que ter discernimento não fazê-los próximos, porem temos que os ter. Não em grandes números e nem poucos, mas na medida exata para que, algumas vezes, você se interpele a respeito, das nossas dúvidas e incertezas. Tem que haver o senso merecedor de ampla justiça, assim você saberá discernir e construir na sua mente, o que a sua pouca idade não pode gravar.

Que seja concedido a mim, o direito de ajudar a bater neste mal, que silenciosamente corrói a humanidade. Para que o sucesso não suba, nas paredes de minha vaidade, e me faça simplesmente útil ao meu próximo e não o insubstituível e ou o exilado. Que a mesma utilidade, quando chegar a idade, seja motivo de incentivo a muitos que padecem no medo e nas incertezas, do futuro sombrio, fechando seus olhos para novas conquistas. Temos que tolerar e ser tolerantes, neste circulo da vida. Tolerar antes de tudo, a nós mesmos! Tolerar vida e dar ouvido a seu ser maior.

Ser maior este, Felipe, que usando a divina providencia, criou para seu filho um canto para ele poder brincar. Deu um nome para este parque: Planeta Terra. Este filho, amado por todos, e por muitos, como você é, vinha nesta área para brincar todos os dias. Nesta mesma terra, a criança caridosa, plantou milhares de roseiras e deu a cada uma das plantas, o nome de família. Elas cresceram. Em cada uma dessa roseira, nasceram flores, feias, más, e sem brilho. Mas também nasceram botões que viraram rosas, bonitas e cheias de cores luminosas. O tempo passava e as flores más e feias debulhavam-se ao vento e ao tempo. Porem os novos botões estavam sempre a caminho. Sempre havia uma nova chance, um novo recomeçar.

José Emílio Fehr Pereira Lopes

A criança visitava sua plantação, de “famílias” todos os dias. As observava e as cuidava, regando cada uma, pacientemente. Sabia o nome de cada uma, sem deixar, uma se quer, de lado. Nutrias as “famílias” com ensinamento e com bondade. Ensinava a planta ter perseverança, e não deixar suas flores ficarem feias ou despedaçadas. Levava sabedoria que as jovens rosas, não tivessem pressa em amadurecer, e que as mesmas maduras, já não tinham mais como fazer o caminho inverso. E que se este fosse o curso natural, que o mesmo ocorresse sem desespero, pois cada idade tem o seu prazer e a sua dor. As que ele deixava envelhecer, eram outras cuja a utilidade delas seria manter a chama viva, ser o caule além de flor, no ofício da sustentação da família, dos filhos e produção de sementes. O Menino Deus, nas suas vindas diárias, observava nas suas “Famílias” a existência de rosas de todos os tipos, algumas eram lindas e muito bonitas. Ele olhava estas flores, e via que estas rosas eram especiais, que não pereceriam com o tempo, com a mazela do vento, com a vaidade alheia e com a injustiça.

Ele então querendo alegrar a sua Mãe, levava para ela, sempre ao final de seu dia, um presente. Andando pelas roseiras, ele procurava os mais lindos botões das flores que estavam sendo cultivadas. Eram frutos da “família” que ele sabia que nunca iriam envelhecer. Sendo assim, estas flores já haviam cumprido sua missão. Eram estas as rosas, que ele queria que fossem levadas, para fazer parte de um imenso jardim que seria colocado aos pés, da Mãe Maior, a Mãe desse menino, a qual vive na luz eterna e da esperança.

Quando escrevi o romance: *Mulheres de Agosto*, eu sabia que estas mulheres possuíam uma força que iria além da delimitação e explanação de qualquer ciência. São forças maiores que podemos compreender ou se aposar.

E tal grandeza era esta minha Prima, que neste mesmo mês, em um dia de Agosto, ela me fugiu entre os dedos.

E foi neste dia, que sem pedir licença, esta criança dona das flores entrou em seu lar. Com uma tesoura, sem dor, com tamanha e indescritível precisão, cortou a sua rosa. Levou consigo a flor que ele viu que era a mais bonita, para fazer parte dessa única coleção, que não cabe misturar-se seu odor, as que aqui ficaram. Ela de tão linda, nunca nos pertenceu! Ela só veio para nos dar coragem, para perseguir nesta luta que nunca se acaba.

Mesmo com este entendimento, vem a saudade. E quando pensar em sua Mãe, meu Primo, olhe para o céu, veja a estrela azul mais brilhante, haverá sempre duas formando um par, são os olhos de sua Mãe que o protege. Respire fundo e com fé, o perfume que ali permaneci, da nossa flor, de nosso amor, de nossa existência, que diferentemente de nós, ela vive na luz que jamais se apaga.

Não é desejo que sua “rosa” seja escolhida. Pois para nós, é o entendimento que nossos afetos se foram. Mas se assim você entender, é compreensível que você possa chorar. Mas que seja transformado em força para prosseguir o exemplo que foi lhe marcado, nesta vida, o quem foi sua Mãe!

Ao se lamentar e sofrer, não há nada que se possa negar ou se culpar.

Se formos merecedor, por termos concluídos nesta vida, a missão de termos sido bons homens e boas mulheres, teremos a graça de poder, ao sentir saudades, E aqui que haja amor, sempre, para recomeçar. Feliz é você Felipe, por ter sido fruto dessa rosa eterna. E a nós que ficamos, temos que plantar outras flores. Por minúscula que ela seja planta, manteremos regada em cada ato, e acompanhemos o seu crescimento, para que saibamos de quantas vidas são feita uma árvore.

E se tudo isso acontecer, nestas palavras, é como me cabe, desejar que você cresça com a semente deixada em suas mãos, no beijo apertado e querido, que a tua lembrança, não poderá fazer vê-los, mas a sua inteligência e sabedoria, será iluminado pelos faróis de safira vindos do amor de uma mulher guerreira, e presente, que te acompanharão entre tudo e todos, todos os dias que ainda virão, pois estes mesmo, de tão fortes, jamais vão.

De seu primo, José Emilio.

A

Renata Fehr de Camargo.