

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

JEAN GONZALES MENEZES

**Efeitos do metil-jasmonato nanocarreado (A14) na redução da
proliferação celular, inibição da angiogênese e indução de apoptose em
células de melanoma (B16/F10) implantadas em camundongos**

RIBEIRÃO PRETO

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Menezes, Jean Gonzales

Efeito do metil-jasmonato nanocarreado (A14) na redução da proliferação celular, inibição da angiogênese e indução de apoptose em células de melanoma (B16/F10) implantadas em camundongo., Jean Gonzales Menezes; Orientador: Sérgio Britto Garcia, 2011.

56 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Patologia.

1. Metil-jasmonato. 2. A14. 3. Angiogênese. 4. Apoptose. 5. Proliferação celular. 6. Melanoma.

JEAN GONZALES MENEZES

**Efeitos do metil-jasmonato nanocarreado (A14) na redução da
proliferação celular, inibição da angiogênese e indução de apoptose em
células de melanoma (B16/F10) implantadas em camundongos**

**Dissertação apresentada ao
Departamento de Patologia e Medicina
Legal da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para o título de Mestre em
Ciências Médicas**

Área de concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Zucoloto

RIBEIRÃO PRETO

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jean Gonzales Menezes

Efeitos do metil-jasmonato nanocarreado (A14) na redução da proliferação celular, inibição da angiogênese e indução de apoptose em células de melanoma (B16/F10) implantadas em camundongos

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: **Patologia Experimental**

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais **Perci Batista Menezes e Zenita Ap. Gonzales Simão Menezes** por todos os ensinamentos passados...*

A minha mãe que em todos os momentos de minha vida a senhora foi, minha amiga, meu pai, minha irmã e conselheira. A senhora foi minhas pernas quando eu não podia andar, meus olhos quando não podia enxergar, minha boca quando não podia falar... Quando acho que já lhe amo o suficiente, o máximo que posso! Aparece um gesto, um carinho, uma comidinha feita por suas mãos... E me desperta um amor muito maior do que sentia. Te amo minha mamãe...

Ah, ao senhor papai... Quando pequeno lhe via como um herói... O mais forte... O maior.

O tempo passou e muitos dos meus pensamentos mudaram, mas ainda assim não deixou de ser o meu grande papai herói. Seu sorriso, seu abraço e seu amor são suas melhores virtudes. Contudo, somente uma frase resume o que penso sobre senhor: "O senhor é o melhor papai do mundo!!!" Te amo papai...

*Aos meus irmãos **Fabian Gonzales Menezes e Vivian Gonzales Menezes**, os melhores irmãos que Deus poderia me presentear. Como se não bastasse Deus continuou a me presentear, através deles ganhei três lindos e maravilhosos sobrinhos **Léo, Murilinho** e minha afilhadinha **Lívia**... Amo muito, muito, muito todos vocês...*

A Deus pela constante companhia e apoio em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTO

Agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Agradeço por todos os ensinamentos passados, não só aqueles científicos, mas os ensinamentos da vida. Momentos em que eu o observava a maneira como falava de seus filhos e esposa. Seus olhos brilhavam... E mal sabia você que nesta hora estava me apresentando a sua melhor aula...

Claro, como posso deixar de agradecer todos os puxões de orelha, eles me servirão e serviram por toda uma vida.

Agradeço também pelo acolhimento inicial e oportunidade oferecida.

A toda a minha família,

A todos vocês que me apoiaram e incentivaram a continuar em frente. Vocês são os pilares de minha vida, obrigado de coração...

A minha namorada Wagna A. Dias Silva por todo o amor, apoio e amizade, muito obrigado...

Aos meus amigos irmãos: Elaine Fávaro Pipi, Ângelo Fávaro Pipi, Wesley Gonçalves Borges, Hiran Queiroz Stateri, Carlos Henrique Áres Silveira da Motta, Mauro César Silveira Moreira, Rafael Verardino, Fernando Herrero, Ana Paula Boock, Katiussia Siqueira obrigado pelo apoio de hoje e sempre.

A Rosângela Orlandin Lopes, por toda a ajuda nos momentos que mais necessitava, pela intensa amizade e alegria. O trabalho só foi possível graças a sua competência na realização técnica. Muito obrigado Nirda...

Aos amigos pós-graduandos do Departamento de Patologia, em especial: Francine Bertolais, Tassiana Marini, Vinicius Kannen Cardoso, Patrícia Modiano, Cleverton Fernandes, Fernando Tadeu Trevisan Frajácómo, Aline Turatti, Paulo Victória Soares, João Felipe Rito Cardoso, Célia, Mara Rúbia Nunes Celes, Mariângela Ottoboni Brunaldi, Sérgio Souza Figueiredo, Ângelo Augusto Chichia Pasta, Lívia Maria Della Porta, Luísiane de Ávila Santana, Sheila Cristina Lima Sanches e Paula Stramandinoli Prudente por todo carinho, amizade e apoio.

Aos meus amigos do Departamento: Felipe Denipotte Coelho, Camila de Luca Zambonine Gimenes, Rosângela Mazucato Paiva Castania, Neide Terezinha Gonçalves, Antônio de Padoa Martins, Auristela de Mello Martins, Carlos Henrique de Carvalho Ribeiro, Ana Carolina Lourenço Veloni, Lívia e Marlei Josieli Augusto sem vocês o desenvolver desse trabalho seria impossível.

A Capes pelo apoio financeiro durante todo o mestrado.

Por todos aqueles que me incentivaram para a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Um agradecimento especial ao Dr. José Emilio Fehr Pereira Lopes:

A pesquisa exige um trabalho constante e ininterrupto, o tipo de trabalho que não termina nunca. Percebi que de uma forma exemplar conseguiu desenvolver a pesquisa na sua essência.

Ao doutor os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua confiança foi o fator essencial no desenvolver este trabalho.

Muito obrigado por permitir que o A14, fruto de sua pesquisa, fosse utilizado neste trabalho.

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos".

Charles Chaplin

"Malignant melanoma writes its message in the skin with its own ink and it is there for all of us to see. Some see but do not comprehend ".

Dr. Neville Davis

RESUMO

MENEZES, J.G. Efeitos do metil-jasmonato nanocarreado (A14) na redução da proliferação celular, inibição da angiogênese e indução de apoptose em células de melanoma (B16/F10) implantadas em camundongos. Dissertação (Mestrado). Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2011.

O melanoma é um dos cânceres mais agressivos e letais, cuja progressão e desenvolvimento depende de diversos fatores, tais como a exposição a radiação ultravioleta, fenótipo e genótipo celular. Em condições normais, os queratinócitos controlam o crescimento e o comportamento dos melanócitos através do complexo sistema dos fatores de crescimento parácrino e de moléculas de adesão. A perda deste controle acarreta em progressão tumoral. No entanto, o prognóstico e a profunda toxicidade nos tratamentos disponíveis demonstram claramente a necessidade da busca de novos fármacos, que combinem alta eficácia e baixa toxicidade. O metil jasmonato A14 é um composto nanocarreado em uma base de açúcar hidrofílico que apresenta um efeito antitumoral. O objetivo do nosso estudo foi determinar o efeito do A14 no processo de apoptose, angiogênese e regressão tumoral em camundongo com melanoma (induzido por implantação de células B16F10). O A14 não teve toxicidade direta sobre o hospedeiro e reduziu significativamente o volume tumoral, a angiogênese, bem como induziu a apoptose no modelo animal por implantação de células B16F10 subcutânea. O efeito do A14 sobre a neovascularização foi observado em análise histológica e por imunistoquímica. Esse efeito é mediado, em parte pelo bloqueio da expressão do HIF-1, portanto prevenindo a neovascularização tumoral. Concluímos que os efeitos do A14 sobre a neovascularização são compatíveis com a sua ação antitumoral. Novas pesquisas utilizando o A14 podem elucidar o seu uso clínico em humanos.

Palavras chave: Metil-jasmonato; A14; Angiogênese; Apoptose; Proliferação celular e Melanoma.

ABSTRACT

MENEZES, J.G. Effects of methyl jasmonate nanocarriers (A14) in reducing cell proliferation, angiogenesis inhibition and induction of apoptosis in melanoma cells (B16/F10) implanted in mice. Dissertation (Master Science Degree). Department of Pathology and Forensic Medicine - School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, 2011.

Melanoma is one of the most lethal and aggressive cancers, which development and progression are affected by several factors, such as ultraviolet radiation, cell phenotype and genotype. In normal conditions, keratinocytes control melanocytes growth and behavior through a complex system of paracrine growth factors and cell adhesion molecules. Loss of this control drives tumor progression. However, the poor prognosis and/or the deep toxicity of the available treatments clearly demonstrate the requirement of searching for new drugs, contemplating both effectiveness and low toxicity. A14 methyl jasmonate is formulated in an hydrophilic sugar based nanocarrier, and present antitumor effects. The aim of this study was to determine the effect of A14 on apoptosis, angiogenesis and tumor regression in murine B16F10 melanoma. The A14 had no direct toxicity to host and significantly reduced tumor volume, cell proliferation and angiogenesis, as well as increased apoptosis in B16F10 melanoma implanted subcutaneous murine model. The effect of A14 on neovascularization was observed distinctly in histologic analysis and immunohistochemistry. This effect is mediated, in part by blocking HIF-1 expression, thereby preventing neovascularization of the tumor. Further investigations with A14 may eventually elucidate the potential of clinical use in humans.

Key words: Methyl jasmonate; A14; Angiogenesis; Apoptosis; Cell proliferation and Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura – 1 Característica histológica do melanoma
- Figura – 2 Delineamento experimental
- Figura – 3 Imagem do camundongo e enucleação cirúrgica tumoral do GC.
- Figura – 4 Imagem do camundongo e enucleação cirúrgica tumoral do GT.
- Figura – 5 Gráfico do volume tumoral
- Figura – 6 Imagem da imunistoquímica para o anticorpo PCNA expressa no GC.
- Figura – 7 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo PCNA expressa no GT.
- Figura – 8 Índice de expressão de PCNA pelas células tumorais dos grupos experimentais.
- Figura – 9 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo Caspase – 3 no GT.
- Figura – 10 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo Caspase – 3 no GC.
- Figura – 11 Índice de expressão de Caspase – 3 pelas células tumorais dos grupos experimentais.
- Figura – 12 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo CD31 no GT.
- Figura – 13 Índice de expressão de CD31 pelas células tumorais nos grupos experimentais.
- Figura – 14 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo VEGF no GC.
- Figura – 15 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo VEGF no GT.
- Figura – 16 Índice de expressão de VEGF pelas células tumorais nos grupos experimentais.
- Figura – 17 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo HIF – 1 α no GC.
- Figura – 18 Imagem da marcação por imunistoquímica para o anticorpo HIF – 1 α no GT.
- Figura – 19 Índice de expressão de HIF – 1 α pelas células tumorais nos grupos experimentais.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

μm	Micrômetro
A14	Metil-jasmonato nanocarreado
ANOVA	Análise de Variância em Uma Via
B16F10	Melanócito de melanoma de camundongo
BSA	Albumina do soro de bovino.
C57BL/6	Linhagem de camundongos isogênicos.
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
DAB	Diamino benzidine tetrahydrochloride.
DMEM	(Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium): Meio para cultivo celular.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
GC	Grupo controle
GT	Grupo Tratamento
HE	Hematoxilina e eosina
HIF	Hypoxia-inducible factors
IF	Fronte de invasão
iPCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
MJ	Metil Jasmonato
PBS	Phosphate buffered solution
PNA	Área peri necrótica
SFB	Soro fetal bovino
TC	Cerne tumoral
UV	Radiação Ultravioleta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 Melanoma	13
1.2 Diagnóstico e tratamento para o melanoma.....	17
1.3 Metil Jasmonato	21
1.4 Modelo de experimentação animal	23
2 OBJETIVO	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Cultura celular.....	26
3.3 Indução do tumor em camundongos c57bl/6 com células b16f10.....	26
3.3.1 Viabilidade celular	27
3.4 Preparação do metil-jasmonato nanocarreado	28
3.5 Delineamento experimental	28
3.6 Coleta e processamento do tecido	29
3.6.1 Imunoistoquímica	31
3.7 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	48

INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

Os melanócitos originam de progenitores da crista neural que migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário. Após seu amadurecimento torna-se uma célula altamente especializada na proteção da pele contra danos causados pela radiação ultravioleta (UV). Na pele, os melanócitos são alvo de uma variedade de sinais emitidos por seu microambiente, nos quais os queratinócitos desempenham um papel importante, já que expressam e secretam fatores parácrinos específicos, que interferem na função do melanócito (KLUG *et al.* 2010; LAZAR-MOLNAR *et al.*, 2000; WELLBROCK; HURLSTONE, 2010). Um desses fatores é o α -MSH (hormônios estimulante de melanócito) que liga o MC1R (receptor melanocortin-1) a proteína G, localizada na membrana dos melanócitos e ativa a sinalização intracelular induzindo a melanogênese (WU; ZHAO; TREDGET, 2010; BUSCA; BALLOTT, 2000).

O principal fator envolvido na melanogênese é representado por três membros da família da tirosinase (tirosinase, Tyrp 1- tirosinase relacionada à proteína 1 e Dct – dopacromo tautomerase) e são responsáveis pela produção ou de eumelanina (marrom-preta) ou feomelanina (amarela-vermelha) (THODY, 1999). A eumelanina absorve e dispersa a luz UV, atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol. Em outras palavras, indivíduos com maior pigmentação tendem a se queimar menos e bronzeiam mais que indivíduos mais claros. Portanto, a eumelanina apresenta uma maior função fotoprotetora que a feomelanina (OHTA, *et al.*, 2011; VOISEY, 2003; SULAIMON; KITCHELL, 2003).

A luz UV age na melanogênese por um aumento na expressão da tirosinase ou do número de receptores de superfície endotelina-1 (ET-1), que

se liga ao receptor da proteína G acoplada a endotelina (EDNRB), e fator da célula tronco (SCF), que se liga ao receptor tirosina-quinase (KIT). No entanto a irradiação UV pode induzir diretamente a expressão de melanina através do estresse MAP quinase, p38 e o fator de transcrição USF-1, que se liga ao promotor da tirosinase. O p38 também tem se mostrado estar envolvido na produção de melanina induzida por α -MSH (DONG, *et al.*, 2010; WOO, 2010; KLUG *et al.*, 2010; SMALLEY; EISEN, 2000). A absorção de UVB e UVA levam a danos no DNA, que podem ser prontamente reparados pelo sistema de excisão-reparo de nucleotídeo. Uma baixa capacidade de reparo do DNA eleva o risco para o desenvolvimento do melanoma (AUTIER, *et al.*, 2011; YOUNG, *et al.*, 1999).

Em geral, o microambiente inflamatório do tumor, contribui para o fenótipo de malignidade do melanoma, por secretar uma variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores. Células de melanoma metastático são bem equipadas para resposta a estímulos inflamatórios e usa-os como vantagem para seu crescimento (MELNIKOVA *et al.*, 2009).

A inativação ou a ausência das “células tronco dos melanócitos” pode levar a desordens pigmentares, tais como, albinismo, cabelos grisalhos, vitiligo, piebaldismo e melasma (OHTA, *et al.*, 2011; WU, *et al.*, 2010; MIOT, 2009). Além disso, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de pele, como o nevo melanocítico benigno, nevo displásico, melanoma de crescimento radial, melanoma de crescimento vertical e melanoma metastático. Tanto o nevo melanocítico benigno, quanto o displásico são considerados marcadores para o melanoma, e sua presença aumenta o risco de desenvolvê-lo (WOO; EIDE, 2010; SOUZA *et al.*, 2004).

Historicamente a palavra melanoma foi utilizada pela primeira vez, em 1812, por um médico parisiense chamado René Laënnec. Nesse período, a doença estava em crescimento por toda a Europa, apresentando um aumento na incidência de 3-7% ao ano em indivíduos de cor branca, etnicamente classificados como caucasianos. Laënnec foi o primeiro a reconhecer que as lesões melanóticas eram melanoma metastático e não

granulomas negro da tuberculose ou depósito de carbono, comumente encontrado naquela época em autópsia de pulmão. Laënnec usou o termo *melanose*, do grego, para definir o negro a esses tumores (Mc GOVERN, 1952, 1972; DENKLER; JHONSON, 1999).

A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando em uma proporção alarmante, cerca de 5% ao ano durante os últimos 40 anos, em várias partes do mundo possui também uma taxa elevada de letalidade. De acordo com o *American Cancer Society*, o melanoma representa apenas 4% de todos os casos de câncer de pele (PRETRESKO, *et al.*, 2010). Na escócia, o aumento da incidência nos últimos 25 anos foi de 4 vezes nos homens e de 2,4 vezes nas mulheres. Nos Estados Unidos o melanoma é o quinto e o sexto tipo de câncer mais comum em homens e mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011; KONG, *et al.*, 2010; LINOS, *et al.*, 2009; MACKIE, 2005).

No Brasil, conforme dados obtidos a partir nos Registros de Base Populacional de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza, a incidência de melanoma cutâneo variou entre 1,3 e 5,2 por 100 mil habitantes no período de 1978 a 2005 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995). No Rio Grande do Sul, por exemplo, dados demonstram que os melanomas cutâneos mais que triplicaram sua incidência nas mulheres e dobraram nos homens, em menos de 20 anos. Em 2008 o Brasil apresentou 1.303 mortes (749 homens e 554 mulheres) desta doença. Já em 2010 houve uma estimativa de 5.930 novos casos (2960 homens e 2970 mulheres) (INCA 2011; ROCHA *et al.*, 2002; BAKOS 2006).

O melanoma pode-se desenvolver em qualquer área da pele e excepcionalmente pode atingir mucosas, leptomeninges e o globo ocular. Ocorre em igual proporção entre homens e mulheres e o pico de incidência ocorre entre os 40 e 60 anos, sendo bastante rara em crianças (SERIN, *et al.*, 2010; KOH, 1991; EVANS; MANSON 1994; BERWICK, 1998; WAGNER, *et al.*, 2000).

Células neoplásicas são formadas a partir da transformação de uma célula normal. Genes supressores de tumor são silenciados ou

apresentam mutação, como o p53, e proto-oncogenes, como o myc, são ativados, resultando não só no aumento da taxa de proliferação, mas também permitindo que células tumorais colonizem ambientes diferentes de seu sítio primário (TUCK, 2002). Células com potencial tumorigênico apresentam alterações que as tornam auto-suficientes para proliferar; insensíveis a sinais inibitórios de crescimento e resistentes aos programas de diferenciação terminal, senescência ou apoptose. No entanto, possui uma vantagem adaptativa de proliferação e auto-renovação bastante superior a das células normais, além de orquestrar e estimular angiogênese contínua, invadir e colonizar regiões distantes do foco neoplásico primário (TAN, 2007; POLLARD, 2004).

A homeostasia tecidual requer um programa altamente regulado, de divisão e morte celular. A apoptose ou morte celular programada é regulada por uma complexa interação das moléculas pró e anti-apoptóticas. Uma desregulação da apoptose é uma característica comum de câncer e um provável fator no desenvolvimento de tumores benignos e malignos cutâneos. Moléculas anti-apoptóticas são em grande parte representada por proteínas Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, e outros) que impede a ativação mitocondrial e inibe a apoptose, proteínas (XIAP, c-IAP, e outros), que geralmente funcionam como inibidores de caspase (FLORELL, 2005).

Essas moléculas funcionam como receptores específicos na superfície celular chamados de receptores da morte ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. A ativação de proteases, caspases, tem papel fundamental no processo de morte celular. As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico. Pelo menos 14 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos e estão envolvidos no processo de inflamação e apoptose. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalizar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. (LEDEZMA, 2004).

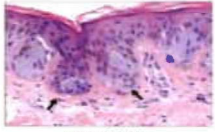



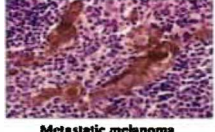
Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros, tal como a caspase-3, é mais distal e agem como efetores da fragmentação celular. Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomas ou ativadas no citosol pelo cálcio, que têm espectro amplo de substratos inespecíficos, as caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura um processo seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo quando se rompe toda a estrutura do citoesqueleto e do núcleo, levando a desestruturação da célula (ANICHINI, 2006; LEDEZMA, 2004; DEL BELLO, 2003).

No entanto, a proliferação tem sido estudada em neoplasias melanocíticas malignas e benignas. Os marcadores de proliferação celular comumente utilizados incluem: topoisomerase II- α , antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e MIB1/Ki-67 (FLORELL, 2005).

1.2 Diagnóstico e tratamento para o melanoma

Para se determinar um prognóstico a esses pacientes, diversos pesquisadores tem se dedicado a um melhor método. Em 1967 e 1969, Wallace Clark descreveu seu sistema de “nível de invasão” para prever a sobrevivência em pacientes com melanoma, sendo posteriormente chamado de “Níveis de Clark”. Esse trabalho contribuiu para outros autores que descreveram o prognóstico em relação ao nível de invasão. Em 1975, outro método de prognóstico foi descrito por Alexander Breslow a partir da espessura tumoral. Sua análise foi baseada no princípio que quanto maior a espessura tumoral, menor era o tempo de sobrevida desse paciente e maior o risco de desenvolver metástase. E até hoje é um método preconizado pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) (ELDER, 2010).

Figura 1- Característica histopatológica do melanoma

Histopathological Appearance	Description	Histologic Features
 <p>Benign nevus</p>	<p>Step 1 The first event is a proliferation of structurally normal melanocytes leading to the benign nevus. Clinically, these nevi present as flat or slightly raised lesions with either uniform coloration or a regular pattern of dot-like pigment in a tan or dark brown background. Histologically, such lesions have an increased number of nested melanocytes along the basal layer (arrows).</p>	<p>Proliferation of melanocytes Benign lesions</p>
 <p>Dysplastic nevus</p>	<p>Step 2 The next step is the development of aberrant growth. This may occur within a preexisting benign nevus or in a new location. Clinically such lesions may be asymmetric, have irregular borders, contain multiple colors, or have increasing diameters. Histologically, such lesions have random and discontinuous cytologic atypia (arrows).</p>	<p>Dysplastic cells Random atypia</p>
 <p>Radial-growth phase</p>	<p>Step 3 During the radial-growth phase, cells acquire the ability to proliferate intraepidermally. Clinically, they sometimes present as raised lesions. These lesions no longer display random atypia and instead show cytogenetic cancer throughout the lesion. In addition to the intraepidermal cancer, the cells can penetrate the papillary dermis singly or in small nests but fail to form colonies in soft agar.</p>	<p>Intraepidermal growth Continuous atypia</p>
 <p>Vertical-growth phase</p>	<p>Step 4 Lesions that progress to the vertical-growth phase acquire the ability to invade the dermis and form an expansile nodule, widening the papillary dermis. The cells can also extend into the reticular dermis and fat, are capable of growth in soft agar, and have the capacity to form tumor nodules when implanted in nude mice.</p>	<p>Dermal invasion</p>
 <p>Metastatic melanoma</p>	<p>Step 5 The final step in the model is the successful spread of cells to other areas of the skin and other organs, where they can successfully proliferate and establish a metastatic focus. These cells can grow in soft agar and can form tumor nodules that may metastasize when implanted in nude mice.</p>	<p>Metastasis</p>

Fonte: New England Journal of Medicine, 2006

Em um estudo clínico-patológico de 17 pacientes com melanoma, observou uma correlação entre a alta sobrevivência e baixa profundidade de invasão (espessura do tumor) e entre a alta sobrevivência e baixa expressão de PCNA por citometria de fluxo. Neste estudo, houve uma maior expressão do antígeno Ki67 e PCNA; marcadores de proliferação e de aumento da sobrevida a esses pacientes, bem como sua correlação com o tipo de tratamento inicial, profundidade de invasão do tumor e invasão do tumor nos vasos sanguíneos e necrose (Figura 1) (MILLER; MIHM, 2006; BEN-IZHAK, 2002).

Os sítios mais freqüentes de disseminação metastática do melanoma cutâneo são a pele, o subcutâneo e os linfonodos (42-59%). Em segundo lugar, como principal víscera envolvida acometida está o pulmão (18-36%) (MEYERS; BALCH, 1998). Sua forma metastática é na maioria das vezes incurável, com sobrevivência aproximadamente de 5 anos (LEE; TOMSU; VON ESCHEN, 2000; MANOLA, *et al.*, 2001).

A angiogênese e a metástase caminham juntas no processo de evolução tumoral. A angiogênese é, portanto, a geração de novos vasos capilares a partir de vasos pré-existentes – etapa essencial para garantir o suprimento de oxigênio e nutrientes a seu crescimento, invasão e metástase da neoplasia maligna. Considerando que o crescimento do vaso sanguíneo é controlado em condições fisiológicas, a progressão tumoral é normalmente associada com a aquisição de um fenótipo angiogênico, associado a uma perda da homeostasia das moléculas pró e antiangiogênicas (STREIT e DETMAR, 2003).

Na região central do tumor ocorre uma perda da homeostasia devido a uma deficiência no suprimento sanguíneo e baixos níveis de oxigênio, portanto são mais resistentes ao efeito da radiação. À medida que ocorre uma redução no volume tumoral, as células sobreviventes parecem obter um melhor suprimento sanguíneo, que pode torná-las mais vulneráveis à radiação (LAWRENCE *et al.* 2004).

HIF-1 é o principal fator envolvido na adaptação à hipoxia. Em condições de normóxia o HIF-1 é clivado e degradado. No entanto, durante a hipoxia, o HIF-1a está estabilizado e interage com o HIF-1b para formar o complexo ativo do HIF-1. Os alvos do HIF-1 incluem os genes que promovem a angiogênese e metástase, principalmente, a potente proteína pro angiogênica, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF modula a proliferação das células endoteliais e da permeabilidade vascular e é abundante em muitos tipos de tumor, carcinomas malignos e as lesões pré-malignas (LEE *et al.*, 2010).

Para que se consiga impedir a metástase, a detecção precoce do melanoma é o fator principal no controle da doença, prevenindo a progressão tumoral e alcançar resultados curativos. O exame clínico confere um diagnóstico em 60% dos casos. Porém o profissional de hoje conta com diferentes maneiras de obter o diagnóstico, tal como, dermatoscopia, dermatoscopia computadorizada, raios-X de tórax, tomográfica computadorizada (CT), ultrassom, imagem por ressonância magnética (MRI), biópsia do gânglio linfático sentinela (SLNB), biomarcadores sorológicos, tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a associação da tomografia por emissão de pósitrons e a tomografia computadorizada (PET/CT) (PRETRESKO, *et al.*, 2010; WASIF; GRAY; POCKAJ, 2011).

A excisão cirúrgica do melanoma cutâneo é a primeira opção de tratamento. A quimioterapia sistêmica também pode ser empregada, porém não causa aumento significativo na sobrevida; 20 a 25% dos pacientes tratados terão uma resposta parcial e apenas 1% terá resposta efetiva e durável. A decarbazina, utilizada de forma isolada é a única droga citotóxica que tem demonstrado taxas consistentes de resposta que variam entre 15 e 25%. Entretanto essa resposta positiva ocorre apenas em poucos meses, principalmente em metástases. Outras drogas têm sido estudadas como as nitrosuréis, a cisplatina e o taxol, porém nenhuma demonstrou superioridade em relação em relação à decarbazina. Vários estudos cooperativos, combinando múltiplas drogas, têm demonstrado aumento na toxicidade sem elevação significativa da resposta (WASIF; GRAY; POCKAJ, 2011; LAKHANI; SELBY; BLISS, 1990; KOH, 1991; BUZAID; MURREN, 1992; WAGNER *et al.*, 2000).

No início deste ano (2011), a Food and Drug Administration (FDA) aprovou Yervoy™ (ipilimumab), como um novo tratamento a pacientes com melanoma em estágio avançado. A decisão é um marco histórico, tendo em conta a relativa falta de tratamentos eficazes e disponíveis para o câncer de pele, para o tratamento de pacientes com melanoma (inoperante) ou metastático irresssecável.

As plantas têm um papel central na prevenção e tratamento das doenças, desde os tempos antigos os humanos já vinham utilizando os constituintes de plantas em tratamento de doenças há um número significativo de drogas modernas potentes usadas na medicina oriundas das plantas. (MANS et al., 2000; TALALAY et al., 2001).

1.3 Metil Jasmonato

Uma série de efeitos colaterais indesejáveis e toxicidades podem ocorrer durante a quimioterapia, e com a utilização de produtos derivados de plantas no tratamento do câncer, podem reduzir os efeitos colaterais adversos. Jasmonato é uma denominação geral para um grupo de hormônios de estresse de vegetais, que regulam os processos de desenvolvimento e adaptação das plantas ao meio ambiente, controlando assim, as respostas a estímulos externos bióticos ou abióticos (WASTERNAK, 2007). A família do Jasmonato é composta dos jasmonato cis (CJ), ácido jasmonico (JA), metil jasmonato (MJ) (JIANG, *et al.*, 2011; COHEN; FLESCHER, 2009), são derivados de ácidos graxos ciclo pentanona que ocorrem exclusivamente no reino vegetal (PEREIRA LOPES, 2009; SEMBDNER; ATZORN; SCHNEIDER, 1994).

Uma substância com efeito promotor senescente foi isolada da Losna ou Absinto (*Artemisia absinthium* L.) identificada como metil jasmonato (DEMOLE; LEDERER; MERCIER, 1962; HISAMATSU, 2006), e foi também isolado do óleo de jasmim, responsável pela fragrância a flor. Embora não houve relatos de atividade biológica a este componente, descrito por esses autores. A primeira vez que foi descrita atividade biológica do MJ foi por Ueda e Kato (1979), como um agente promotor senescente (UEDA; KATO, 1979).

Nos últimos anos foram encontradas diversas características do MJ, tal como, inibidor da proliferação e indutor de morte a diversas linhagens de células cancerígenas de animais e humano, incluindo de mama, próstata, pulmão, cólon, leucemia linfóide, linfoma, neuroblastoma e melanoma

(ROTEM *et al.*, 2005). Além disso, o MJ se mostra seletivo, exibindo sua toxicidade apenas as células malignas preservando linfócitos normais do sangue (FINGRUT, 2002; FINGRUT *et al.*, 2005; GARBE, 2005; HEYFETS; FLESCHER, 2007).

A administração de certos tipos de drogas por meios convencionais, muitas vezes sofre com uma série de inconvenientes, como a solubilidade limitada da droga, má distribuição dentro do corpo, falta de seletividade, farmacocinética desfavoráveis e os danos causados a tecidos saudáveis. Para tentar superar esses problemas, pesquisas sobre como carrear e direcionar essas drogas constitui uma parte significativa do mercado da farmacocinética, o que tem estimado de cerca de 15% de todo esse mercado, cerca de 109 bilhões de dólares em 2008 (MOORE, 2010).

A quimioterapia pode causar uma série de incômodos, incluindo perda de cabelo, problemas digestivos, náuseas, perda de energia e feridas na boca. A nanotecnologia surge como uma forma de terapias dirigidas. O potencial da nanomedicina na terapia do câncer é muito promissora, devido a este fato novas aplicações vem sendo utilizadas com esse fim, seja no diagnóstico ou tratamento (NLEE, 2011; PEREIRA LOPES, 2010; MOORE, 2010). Entre os benefícios da nanotecnologia estão: melhora na farmacocinética de drogas de base protéica; melhora na farmacocinética de medicamentos para doenças comuns tais como, a asma e osteoartrite, cada vez mais comum no envelhecimento da população; aumentar a especificidade e diminuir a toxicidade das drogas e encontrar um sistema que melhore a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos; entre outros (MOORE, 2010).

A natureza hidrofóbica do MJ gera uma dificuldade na administração da mesma em fórmula aquosa, assim como realizar o seu macroencapsulamento, devido à instabilidade de sua composição. Pode ser preparado em propileno glicol e parafina, portanto, há que ser

considerada a biocompatibilidade dos diluentes com a via de administração do preparado. O MJ é de densidade 1.03 g/mL em temperatura de 25 graus Celsius (SIGMA-ALDRICH CO®, 2011).

O MJ é um éster e sua estrutura pode ser degradada pelas esterases metabólicas o que representa uma limitação importante para a sua atuação, *in vivo*. Experimentos foram feitos com a molécula em culturas celulares, para que o MJ mostrasse o seu potencial anti-carcinogênico, 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 Metil Jasmonato puro ou nanocarreado, em mamíferos (PEREIRA LOPES, 2010).

PEREIRA LOPES (2010) desenvolveu um método para solubilizar as moléculas de MJ através do nanocarreamento e verificou a existência de um conjunto de mecanismos antiangiogênicos da molécula, demonstrando e essa substância uma atividade terapêutica promissora contra o câncer. (PEREIRA LOPES, 2010).

1.4 Modelo de experimentação animal

O modelo de melanoma murino em camundongos C57BL/6 tem sido utilizado porque as células B16F10 são cultivadas em laboratório, crescem rapidamente e são facilmente transplantadas em animais, servindo para estudos da fisiopatologia e metástases do câncer de pele (SEO, 2011; JUNQUEIRA JR., *et al.*, 1997).

2 OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram analisar os efeitos do A14 no processo da inibição da angiogênese, redução da proliferação celular e indução da apoptose através da indução do melanoma em camundongo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CETEA), conforme o protocolo de número 189/2010 (Anexo A).

3.1 Animais

O camundongo C57BL/6N, animal de experimentação utilizado neste trabalho, tem pelagem negra, peso médio de 25g e média de vida de 2 anos. O acasalamento pode ser feito entre irmãos logo após o desmame (isogênicos) ou a partir de 54 a 60 dias de vida, quando o roedor atinge a idade adulta. A média de parição por fêmea é de cinco filhotes, com período gestacional de 21 dias (ANDERSEN, M.L. *et al.* 2004).

Foram utilizados 14 camundongos machos C57BL/6 com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), e foram mantidos e acondicionados no biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal (FMRP/USP). Durante todo o experimento os animais foram alojados em gaiolas individuais com um animal por caixa, de plástico fosco com tampa metálica, medindo 19,5 x 29,5 x 13 cm, as quais foram mantidas em salas com temperatura e umidade aproximadamente constantes (temperatura entre 22-25^o C e umidade relativa de 65 a 70%) através de aeração, exaustão e ventilação. A iluminação da sala foi mantida em ciclo de noite/dia de 12 h, sendo a fase escura iniciada às 18h00min.

Os camundongos foram alimentados com ração PURINA®, balanceada para roedores e água *ad libitum*. Todos os camundongos

foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo três dias antes do início do experimento.

3.2 Cultura celular

A linhagem celular B16F10 utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pela Prof^a Dra. Gabriela Silva Bisson do Laboratório de Genômica e imunobiologia da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementada com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen) (FRESHNEY, 1988). As células foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e umidade controlada. Para que houvesse sempre um estoque, as células foram congeladas em meio RPMI 1640 suplementada com 80% SFB e 20% DMSO (Dimetilsulfóxido Sigma, St. Louis, MO) em nitrogênio. As suspensões celulares utilizadas para a implantação nos animais foram obtidas após o tratamento dos frascos de cultura com Tripsina 0,05% por 5 minutos e inativação com 10% de SFB. As células desprendidas foram centrifugadas e ressuspensas em PBS e a concentração celular ajustada por contagem em câmara de Neubauer, onde a cada 100µL houvesse 10⁵ células B16F10 ou solução 10⁵ células /mL.

3.3 Indução do tumor em camundongos c57bl/6 com células b16f10

Os animais foram anestesiados com quetamina/xilasina (21 µL de quetamina; 4,5 µL de xilasina e 74,5 µL de PBS estéril), permitindo a depilação de parte do dorso para a administração das células. As células foram administradas por via subcutânea com seringa e agulha de insulina (BD, Ultra-fine™ II, agulha 8 mm comprimento 5/16" e calibre 30G). Todos os animais foram observados diariamente para avaliação do crescimento tumoral. Ao final dos experimentos com células B16F10 todos os animais

foram submetidos a eutanásia e a região dorsal onde se encontrava o tumor foram retiradas com auxílio de um bisturi para a análise morfológica e histológica. As amostras retiradas, feita a análise externa e obtidas as imagens, foram fixadas em formol tamponado 10% por 24 horas e encaminhadas para processamento histológico no laboratório de Biologia do Câncer do Departamento de Patologia e Medicina Legal (FMRP/USP). Os cortes histológicos foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina e analisados por microscopia de luz no mesmo laboratório (GARCIA, 2006).

A comparação morfológica da evolução tumoral foi realizada diariamente com a utilização de um paquímetro mecânico e nos resultados foi utilizada a fórmula; $V = (\text{altura}) \times (\text{largura}) \times (\text{espessura}) \times \pi/6$, os resultados foram dados em milímetro cúbico (mm^3) (FELDMAN, 2009), avaliando assim o potencial tumorigênico das células B16F10.

3.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade das células foi verificada com o corante vital Azul de Tripán. Células vivas apresentam-se não coradas, refringentes à luz, enquanto as células mortas coram-se em azul. A viabilidade dos cultivos celulares foi determinada, então, pela contagem das células em câmara de Neubauer em microscópio óptico. As células viáveis e não viáveis foram contadas em porcentagem de células totais. Considerou-se adequada, a cultura com um total de pelo menos 95% de células viáveis.

3.4 Preparação do metil-jasmonato nanocarreado

O MJ (1R, 2R)-3-Oxi-2-(2Z)-2-pentenil-ciclopentanoacetato (metildihidroxijasmonato 96% Sigma Aldrich – Missouri – USA), fórmula: $C_{13}H_{22}O_3$ e peso molecular de 226.31, gentilmente cedido pelo Dr. José Emilio Fehr Pereira Lopes para realização do nosso experimento, 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 à MJ 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 será centrifugada por 5 min a 10.000 rpm em uma microcentrífuga. A fração orgânica contendo o MJ 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). O espectro obtido foi comparado com relatos de literatura (MUELLER, *et al*, 2006). O MeJa, 3 mg/mL foi incorporado à nanopartículas lipídicas a um volume de 500 μ L de suspensão de LDE (40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol secos a vácuo, por 16h, a 4°C). 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 metiljasmonato remanescente na preparação (PEREIRA LOPES, 2009).

3.5 Delineamento experimental

Após um período inicial de 3 dias de adaptação, todos os animais foram inoculados 100 μ L da solução de SFB com uma concentração de 1×10^5 de células B16F10, subcutâneo na região dorsal. Aproximadamente 8 a 10 dias após a inoculação celular, os tumores se

encontravam palpáveis, a partir deste período foi realizada a mensuração tumoral diariamente e início do tratamento (FAVERO, *et al.*2010).

Os 14 camundongos foram divididos em 2 grupos por alocação casual probabilística. Convencionou-se denominá-los grupo controle (GC) e grupo tratamento (GT). No GC os camundongos receberam 100 μ L de soro fisiológico, o GT recebeu nove aplicações de 100 μ L de A14, sendo uma ao dia. Seguindo o mesmo horário para todas as aplicações. Todos os animais foram submetidos a eutanásia no décimo dia (totalizando 9 doses de A14 e soro fisiológico). A avaliação *in vivo* constituiu no tratamento intraperitoneal em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma, inoculados com a linhagem celular de melanoma murino B16F10.

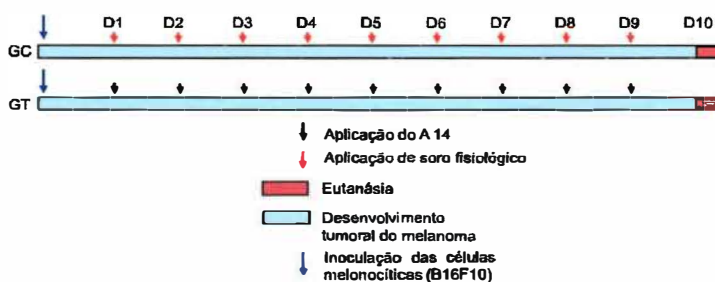


Figura 2- Delineamento experimental.

3.6 Coleta e processamento do tecido

Os animais foram eutanasiados no décimo dia utilizando a câmara de CO₂ e em seguida foram submetidos à biópsia excisional tumoral junto ao tecido adjacente. O tumor retirado foi seccionado em fatias de aproximadamente dois milímetros e submerso em formalina tamponada a 10% por um período mínimo de 24 horas. Após esse período os tecidos foram retirados da formalina, recortados e processados. Já recortadas as peças foram desidratadas por submersão

em alcoóis de concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%) por um período aproximadamente de cinco horas.

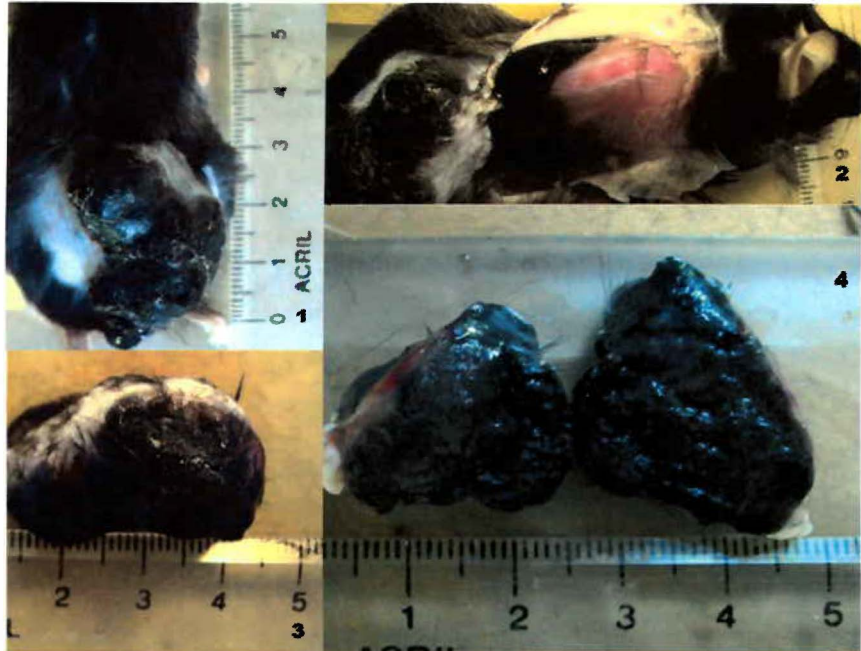


Figura 3- Imagem do camundongo do GC. Foto - (1) avaliação geral do tumor; (2) - difusão da massa tumoral; (3) - excisão cirúrgica tumoral; (4) - macroscopia interna tumoral.

Posteriormente para diafanização do material as mesmas foram submersas em banhos de xilol 100% por aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Em seguida as amostras foram submersas em banhos de parafina líquida em uma temperatura de 60°C por um período de 4 horas, seguindo então para a inclusão em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes com 5µm de espessura; posteriormente foram montados em lâminas.

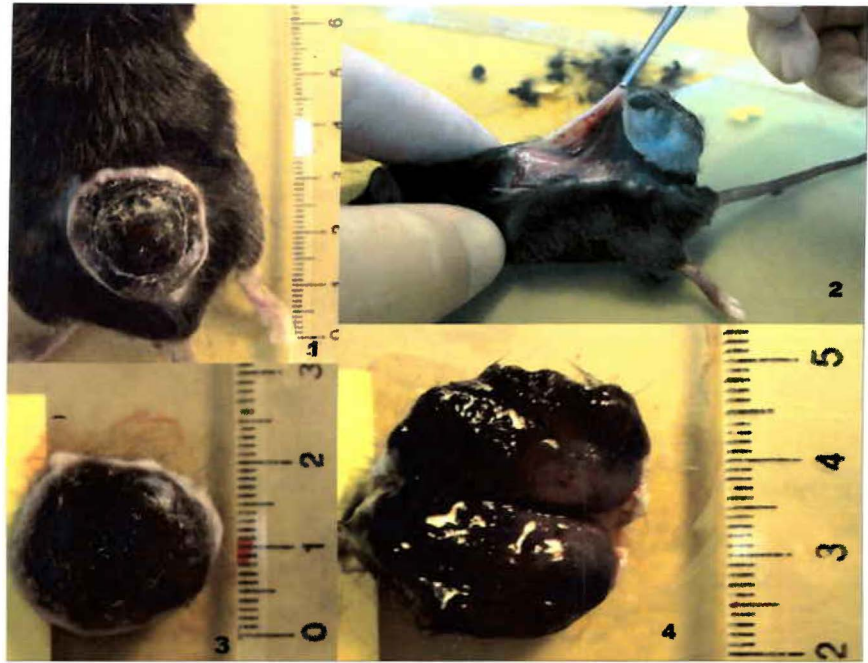


Figura 4- Imagem do camundongo do GT. (1) avaliação geral do tumor; (2) - difusão da massa tumoral; (3) excisão cirúrgica do tumor; (4)- macroscopia interna do tumor.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e contra coradas com solução de Eosina Floxina por 10 segundos. Para posterior desidratação a lâmina foi submersa em concentrações crescentes de alcoóis e em seguida diafanizadas em xilol que é meio miscível de Entelan® (Merck & Co. Inc, AS) utilizado para montagem das lâminas.

3.6.1 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram feitas em cortes histológicos do tumor através da reação antígeno-anticorpo seguida da reação com marcador visível ao microscópio. As lâminas desparafinadas e hidratadas passaram por um processo de recuperação antigênica através da incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após o resfriamento do material as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de soro de cavalo. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário para iPCNA (Novocastra®,

clone PC 10) em diluição de 1:50, Caspase 3 (Leica Biosystems Newcastle Ltd. ®, clone JHM62) em diluição 1:50, CD 31 ((PECAM-1)Novocastra®, clone 1A10) em diluição de 1:200; HIF-1 α (Abcam®, clone H1alpha67-sup) em diluição 1:50 e VEGF (Leica Microsystems®, clone KLT9) ambos incubados com anticorpo secundário por 30 minutos, seguindo para o polímero conjugado também por 30 minutos e corou-se com DAB por um minuto; todos os *Kit Pic-Ture™ MAX Polymer* (ZYMED® Laboratories). As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por um minuto e montadas com Entelan para posterior análise em microscopia de luz (GARCIA et al. 2006; PEREIRA LOPES, 2009). A imunoreatividade foi considerada positiva quando detectada coloração no citoplasma das células para a marcação de Caspase-3 e VEGF, membranas para CD31 e nuclear para a marcação do PCNA e HIF-1 α . O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número fortemente corado no campo óptico.

3.7 Análise estatística

Dois pesquisadores, independentemente avaliaram a imunistoquímica e histoquímica por *Southwestern*. Ambos observadores desconheciam a identificação dos grupos. As células tronco, melanocíticas e células transformadas, com uma maior capacidade de iniciação tumoral provavelmente residem áreas adjacentes aos vasos sanguíneos tumorais, ou são originários de áreas mal perfundidas e hipóxicas, a qual tenham se adaptado (Rak et al., 2008), os cortes de tecido tumoral foram divididos em três áreas, e analisados separadamente: Frente de Invasão (IF): uma margem, cerca de 30 μ m de espessura que cerca o tumor, Cerne Tumoral (TC): o tumor de forma homogênea no interior e densamente povoadas por células do parênquima do tumor, incluindo o microambiente do tecido estroma tumoral, e a Área peri necrótica (PNA): uma área de margem de 30 μ m de espessura em torno dos focos irregulares e disseminação de necrose.

Duas regiões, representando cada um dos tumores foram avaliadas para cada um dos animais estudados.

Só assim os tecidos de imunohistoquímica foram considerados no estudo. Para a avaliação, pelo menos cinco campos microscópicos na potência média (40X), foram retirados aleatoriamente de locais diferentes em cada corte do tecido corado e quando possível até dez locais foram analisados de regiões diferentes dos tumores.

A imunocoloração foi considerada positiva quando o núcleo e o citoplasma das células foram marcados com destaque (marrom arroxeada / marrom avermelhado). O padrão de marcação foi caracterizado como apenas nas situações: citoplasmáticas, nucleares e ambos citoplasmáticos e nucleares. As células positivas por imuno e as presente nos vasos sanguíneos foram quantificadas em microscópio óptico. Um total de 10 campos (40x) foram escolhidos ao acaso.

A densidade microvascular (MVD) em cada tumor foi avaliada pela contagem de vasos positivo para CD31. A expressão de CD31 foi detectada por métodos imunohistoquímicos como mencionado anteriormente. Para a contagem de microvasos, colorações positivas para MVD em 3 áreas mais altamente vascularizado ("hot spots") em cada campo óptico, MVD foi contada e expressa como a média da contagem microvascular nestas áreas. Qualquer célula endotelial marrom ou o conjunto de células endoteliais foram contados como um microvaso, desde que separadas dos outros microvasos vizinhos, de células tumorais e do tecido conjuntivo, enquanto que os vasos com a espessura da camada muscular ou diâmetro acima de oito eritrócitos não foram contados. O número de células TUNEL-positivo foi avaliado em 10 campos microscópicos em cada amostra, a partir da qual os valores médios foram obtidos. Apenas as células com reconhecimento morfológico positivo foram contadas e foram consideradas positivas quando nítida coloração nuclear marrom fosse detectada ao núcleo.

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o software *Graph Pad Prism 5.0* (San Diego, Califórnia). Foi utilizado para

as análises de iPCNA, Caspase-3, HIF-1 α , CD31 e VEGF o teste de Kolmogorow-Smirnov para identificar o padrão de normalidade das amostras. Para verificar as diferenças entre as médias dos grupos para cada variável dependente foi utilizada a Análise de Variância em uma via (One-way) e em duas vias (Two-way) – ANOVA. Foi adotado um nível de significância de 0,05; e a média foi dada \pm erro padrão da média. Quando se verificou diferença entre as médias ($p < 0,05$), foi utilizado pós-teste de Tukey's (One-way) e Benferroni (Two-way). Os dados obtidos para avaliar a evolução tumoral (Gráfico 1) foram aplicados o teste de Mann-Whitney para comparação entre duas variáveis que não apresentaram distribuição normal. O nível de significância escolhido foi de 5% e os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

O GT mostrou uma evolução tumoral mais lenta (Figura 5) com diferença estatística de $p < 0,05$, a partir do 5º dia de tratamento.

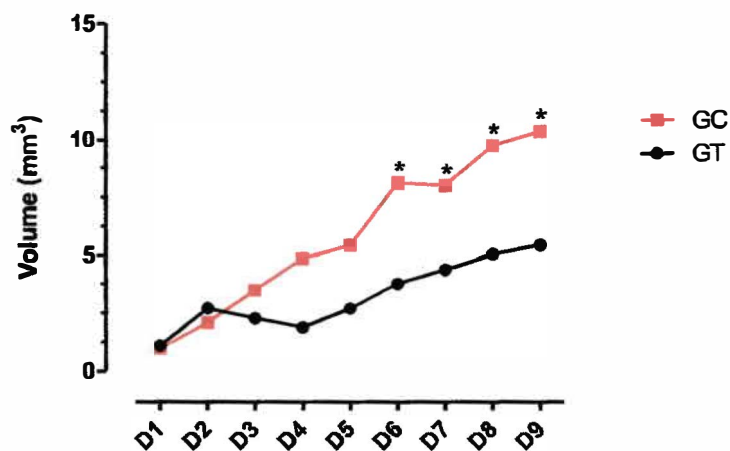


Figura 5- Gráfico do volume tumoral (mm³) mostrando um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) com uma média de diferença de 48%, a partir do 5º dia de tratamento. Realizado o pós-teste estatístico de Benferroni (Two-way) e com o teste de Mann-Whitney.

Macroscopicamente os tumores dos animais GC mostraram-se mais flácidos e com invasão aos tecidos subcutâneos e adjacentes (Figura 3), já os animais do GT, a massa tumoral mostrou-se com uma pseudo cápsula e consistência firme a essa massa (Figura 4).

A aplicação do A14 levou a uma redução da proliferação das células tumorais demonstrado pela marcação positiva de PCNA (Figura 7). No entanto, um significativo aumento da marcação de iPCNA diante do grupo controle (GC), nas regiões da PNA e IF (**, $p < 0,005$) (Figura 6), e não houve diferença estatística na área do TC (Figura 8).

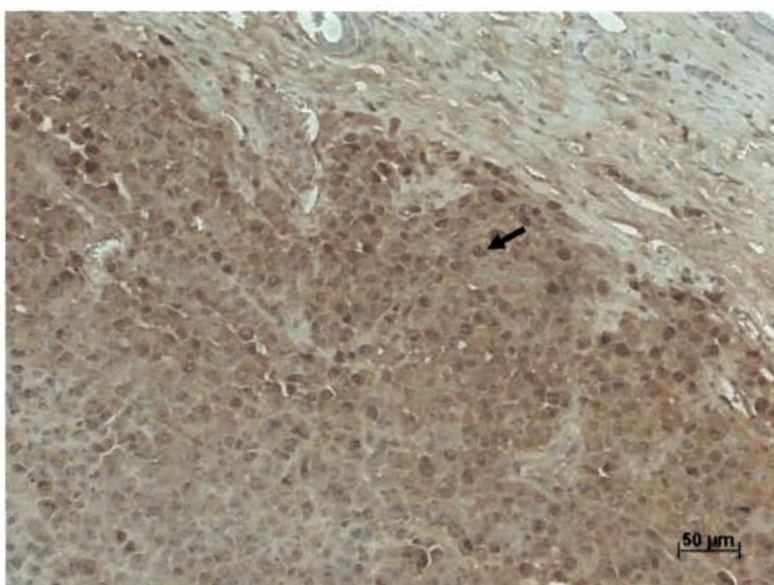


Figura 6- Imagem por Imunohistoquímica para o anticorpo PCNA (seta), no GC. Representado pelo aumento de 40X.

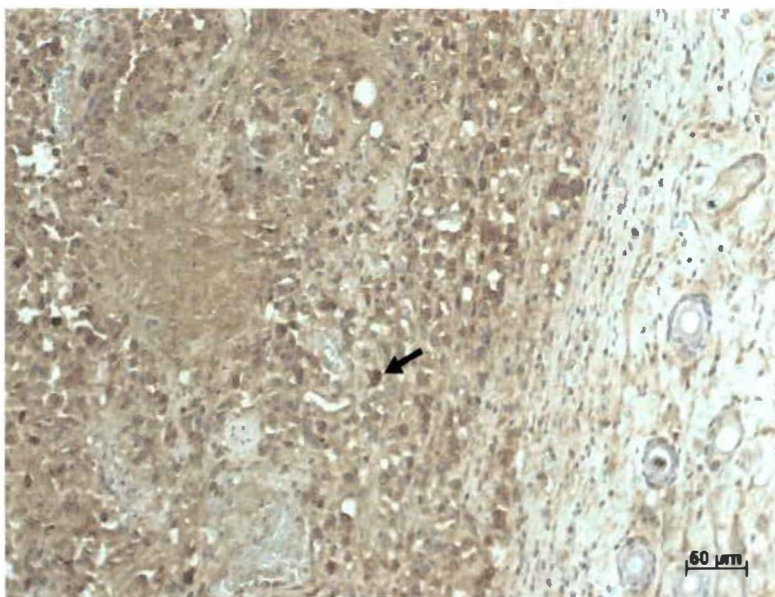


Figura 7 - Imagem por Imunohistoquímica para o anticorpo PCNA (seta), no GT. Representado pelo aumento de 40X.

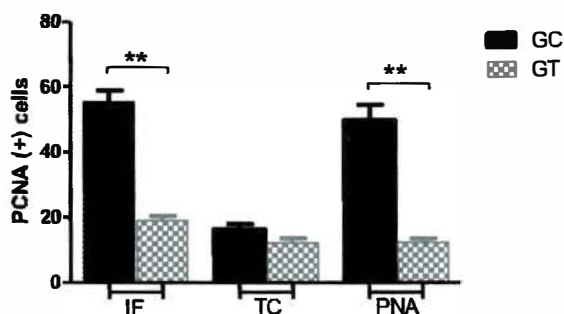


Figura 8 – Índice de proliferação celular expressa no tumor. IF = *Invasion Front*, TC = *Tumor Core* e PNA = *Peri-necrotic area*, Amostra não-paramétrica, teste estatístico Two-Way ANOVA , pós teste Bonferroni. ** $p < 0,005$.

Houve uma maior indução de apoptose nos animais tratados com o A14, avaliados pela expressão de Caspase 3 (Figura 9), comparado a pouca expressão nos animais do GC (Figura 10). Obtivemos um resultado com uma diferença estatística de $p < 0,005$ em todas as áreas do tumor (IF, TC e PNA) (Figura 11).

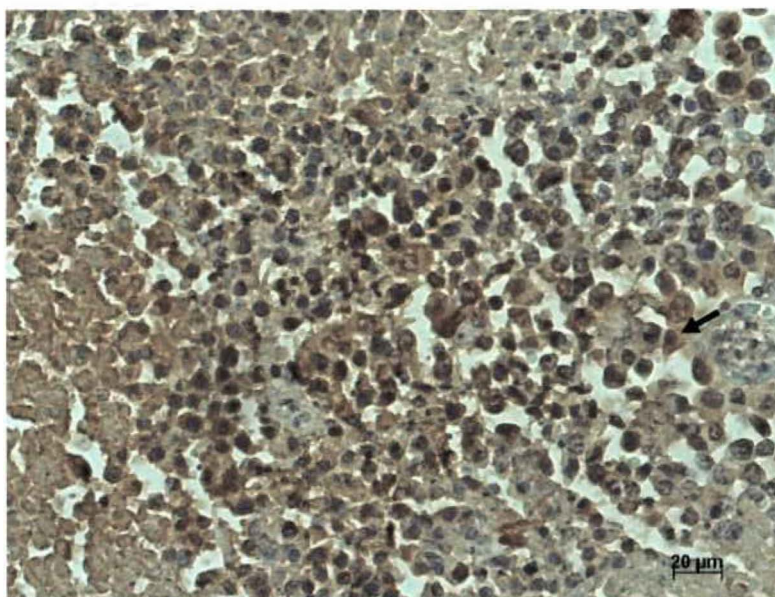


Figura 9 - Imagem da marcação por imunohistoquímica para Caspase-3 no GT (seta), em um aumento de 40X.

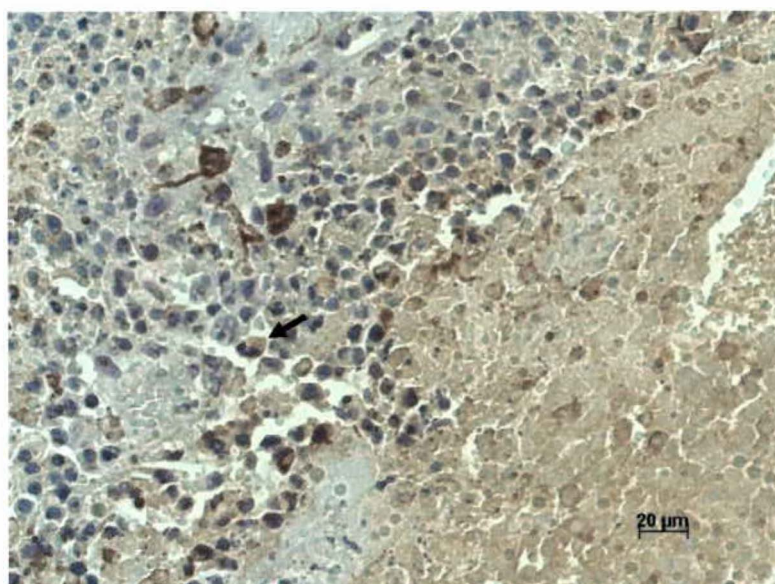


Figura 10 - Imagem da marcação por imunohistoquímica para Caspase-3 no GC (seta), em um aumento de 40X.

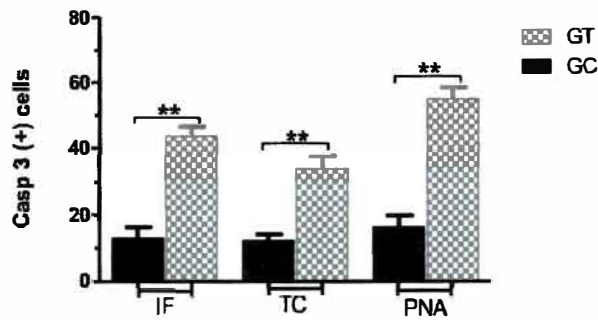


Figura 11 - Índices de marcação para Caspase 3. IF = Invasion Front, TC = Tumor Core e PNA = Peri-necrotic area. Teste estatístico Two-Way ANOVA, pós teste Bonferroni, ** $p < 0,005$, expressão de caspase 3 no GT.

Os dados da figura 12 e 13 mostram uma menor expressão de CD 31 nos animais do GT comparados ao GC, evidenciando uma inibição da angiogênese significativa ($p < 0,005$) nas regiões da PNA e IF, não houve diferença estatística na região TC.

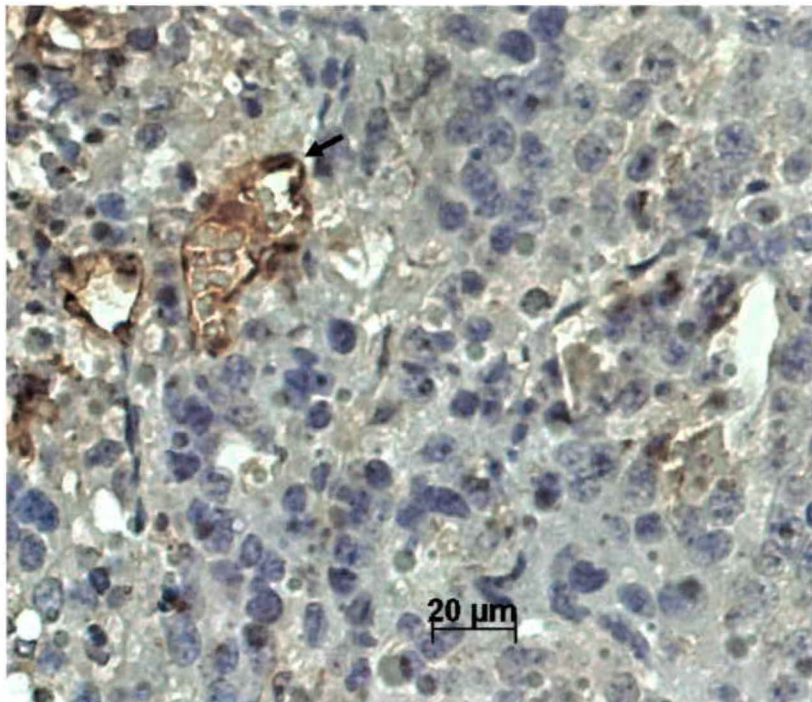


Figura 12 - Imagem da marcação por imunohistoquímica para CD31 no GT, em um aumento de 40X.

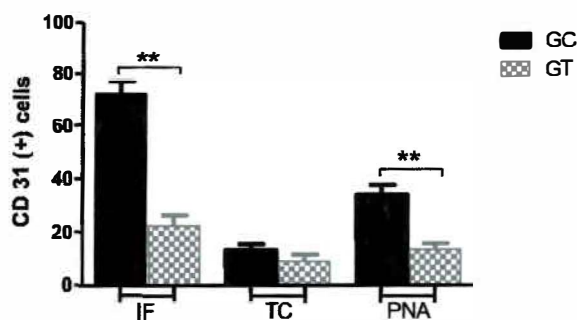


Figura 13 - Índice de marcação para angiogênese CD31 (PECAM-1). IF = Invasion Front, TC = Tumor Core e PNA = Peri-necrotic area. Teste estatístico Two-Way ANOVA , pós teste Bonferroni, $p < 0,005$, de expressão de CD31 no GT. Na área TC não houve diferença estatística.**

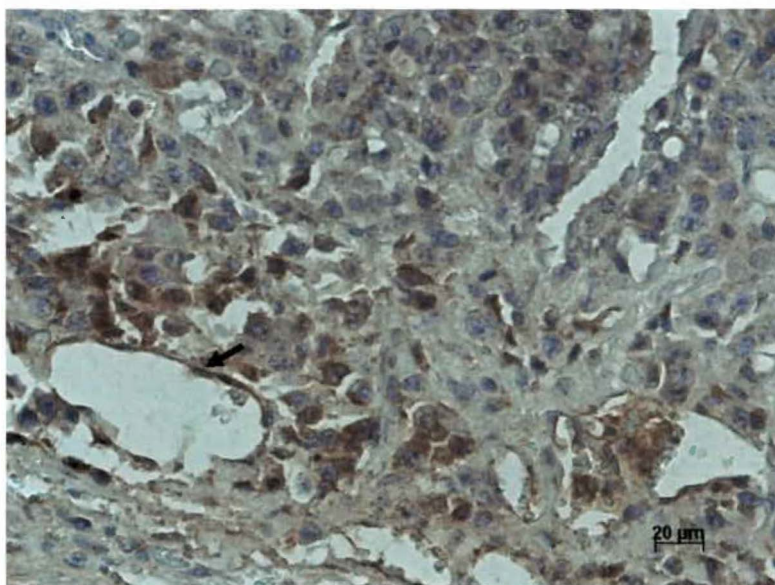


Figura 14 - Marcação positiva para VEGF no GC (seta), com um aumento de 40X.

Houve uma maior marcação de VEGF nos animais do GC comparado aos animais do GT (Figura 14 e 15). Uma maior expressão de VEGF foi observada na região de IF, comparado ao GT com uma diferença estatística de $** 0,005$, na região de TC não houve diferença estatística, já na região PNA não houve expressão de VEGF em ambos grupos (Figura 16).

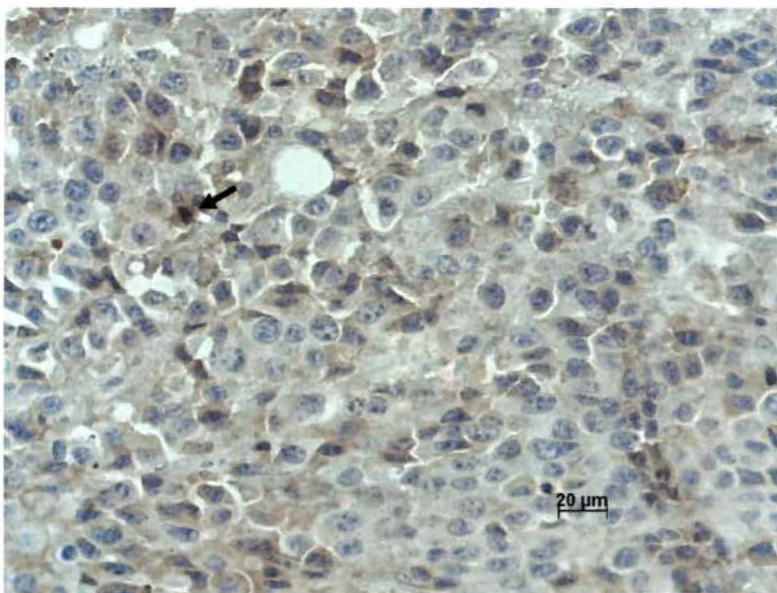


Figura 55 - Marcação para imunohistoquímica mostrando marcação negativa para VEGF no GT, com um aumento de 40X.

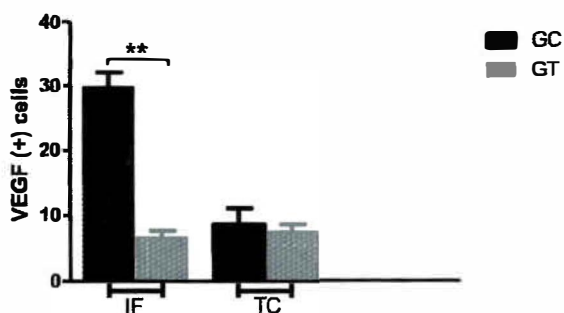


Figura 16 - Índices de marcação para VEGF. IF = *Invasion Front* e TC = *Tumor Core*. Teste estatístico Two-Way ANOVA , pós teste Bonferroni, **p < 0,005.

Nos animais do GC houve uma maior expressão de HIF – 1 α nas regiões PNA e IF comparado ao GT, mostrando uma diferença estatística de ** 0,005. Já a mesma diferença não foi observada na região TC (Figura 17 a 19).

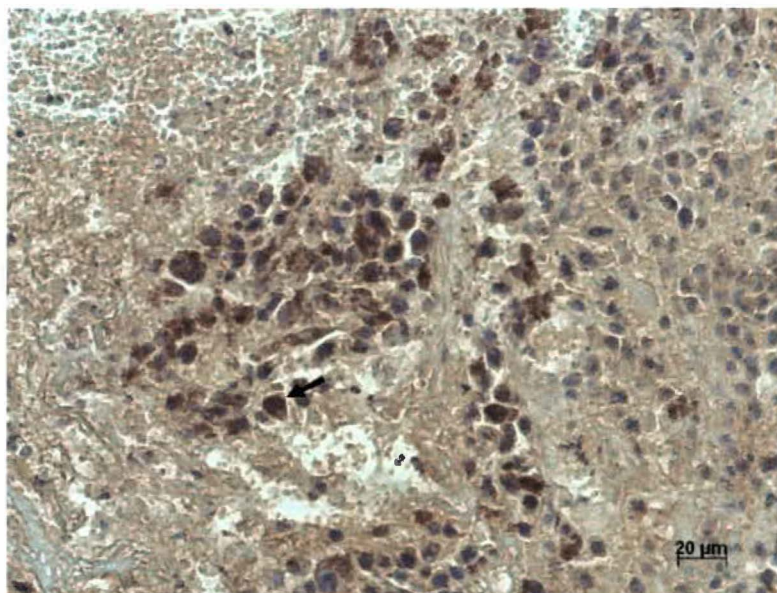


Figura 17 - Imagem da marcação por imunohistoquímica para o anticorpo HIF-1 α no GC

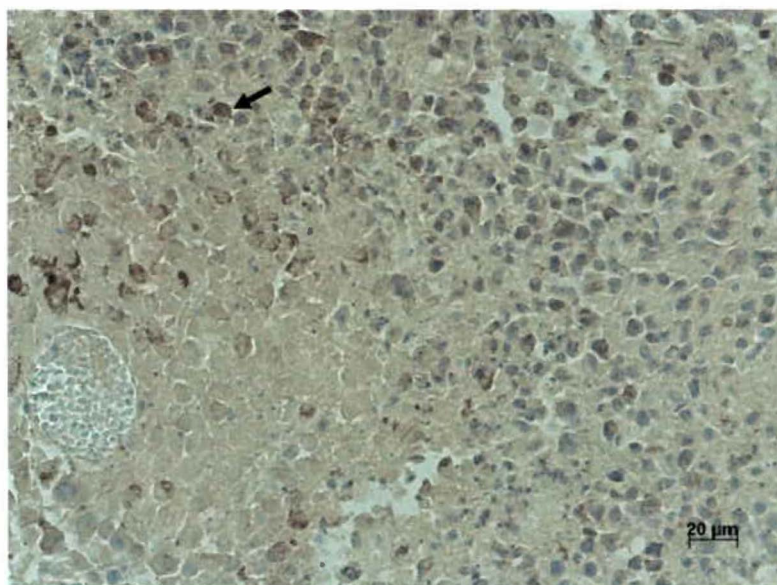


Figura 68 - Imagem da marcação por imunohistoquímica para o anticorpo HIF-1 α no GT (seta).

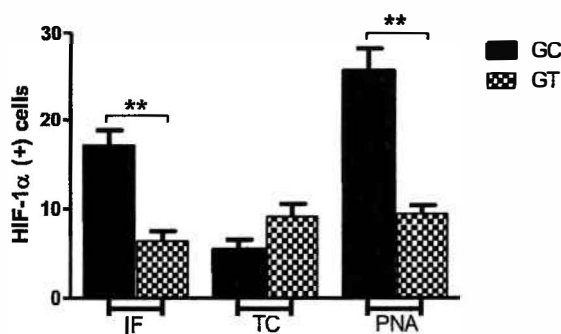


Figura 19 - Índices de marcação para HIF-1 α . IF = *Invasion Front*, TC = *Tumor Core* e PNA = *Perinecrotic area*. Teste estatístico Two-Way ANOVA, pós teste Bonferroni, **p < 0,005.

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que o A14 promove efeitos em células de melanoma B16F10, impedindo o crescimento tumoral, levou a indução de apoptose, inibição da angiogênese, inibição da proliferação celular.

O Jasmonato pode impedir a proliferação das células cancerosas e induzir a sua morte. Possui duas características desejáveis das drogas anti-câncer, é altamente seletivo para as células cancerosas e ineficaz para as células normais, e tem a capacidade de agir contra células resistentes aos medicamentos. O MJ mostrou-se significativamente mais citotóxico às células leucêmicas do que aos linfócitos normais (COHEN e FLESCHER, 2009). Induziu a morte, por apoptose, as células cancerígenas, tanto as células ativas quanto seus clones (FINGRUT e FLESCHER, 2002; FLESCHER, 2007), evidenciando que o Jasmonato pode contornar a resistência mutante das células que expressam p53 em relação à quimioterapia, induzindo um modo não-apoptótico a morte celular (FINGRUT et al., 2005). Recentemente, YERUVA et al. (2008) demonstraram efeitos semelhantes do Jasmonato contra os cânceres de próstata e de mama (YERUVA et al., 2008a, b).

Com efeitos anti-mitocondrial do MJ age na despolarização da membrana mitocondrial, edema e liberação de citocromo C. O citocromo C é um componente ativo durante o metabolismo celular que ocorre dentro da mitocôndria, é também o responsável por ativar uma via apoptótica irreversível, ancorada na caspase 3, por meio da caspase 9 e esta por sua vez, por meio da APAF-1 (Heyfets e Flescher, 2007; ROTEM, *et al.* 2005). Da mitocôndria também parte o fator indutor da apoptose (AIF) que aciona diretamente proteínas fragmentadoras do DNA (ICAD/CAD). Por outro lado, outro estímulo extracelular pode ser ativado, pela ligação de citocinas – FAS-L e TNF- α – ao receptor celular denominado “receptor de morte”. Uma vez ativado por indução, este receptor ativa uma cascata de proteínas intracelulares onde estas determinam e executam a apoptose, tal como, FADD –caspase 8 – caspase 3 – ICAD/CAD e fragmentação do DNA. Desta forma o receptor de morte é ativado, por outra via que leva a mediação para a mitocôndria e ativa o citocromo C e volta ao mesmo destino já descrito acima (ANDRADE e ROSENBLATT, 2011). Dado também confirmado por PARK, *et al.*, (2010) utilizando células de hepatocarcinoma de humano e tratamento com um derivado sintético do MJ (J-7), induzindo a apoptose através da ativação da Caspase-3. A busca por drogas que induzem a apoptose em linhagem de células de melanoma continua a fim de combater o seu desenvolvimento e metástase (DEL BELLO, 2003).

O pesquisador Judah Folkman (1971), conhecido pela sua ampla dedicação no processo da angiogênese, sustenta o conceito de que para que um determinado grupo de células consiga manter um crescimento sustentado é necessário que exista uma fonte de suprimento sanguíneo específico e constante, e que angiogênese esteja relacionada não apenas ao crescimento tumoral, desempenhando ainda uma importante ação no processo de formação e desenvolvimento de metástases (FOLKMAN, 2003).

Hoje se sabe que o mimetismo vascular é um processo complexo caracterizado pela capacidade agressiva das células

melanocíticas em formar uma matriz extracelular rica em vasos ao redor das células tumorais. Um dos métodos de avaliação da angiogênese consiste na determinação da densidade vascular. De modo a avaliar a relação entre a angiogênese, o prognóstico e o estadiamento, utilizou-se um marcador pan-endotelial, o CD31 que é um marcador com especificidade funcional acentuada, preferencialmente expresso nas células endoteliais dos tecidos em processo de angiogênese ativa (PISACANE, 2007). Nossa pesquisa confirma esses resultados, mostrando uma maior expressão de CD31 nas áreas IF e PNA dos tumores do grupo controle do que nas áreas correspondentes do grupo tratado (ver figura 11 e 12).

O aumento da expressão de CD31 pode estar relacionado com um aumento dos genes envolvidos na angiogênese, ocorrendo em áreas de baixa concentração de oxigênio conforme descrito em modelos experimentais de hipóxia (PISACANE, 2007). A hipóxia não só está relacionada com a possível expressão de CD31, mas também na maior expressão de VEGF. A linhagem de célula B16F10 expressa constitutivamente VEGF. A regulação da expressão do VEGF na linhagem celular B16F10 melanoma é desconhecida. Neste estudo, observou-se inibição da secreção de proteínas VEGF, em associação com a inibição da atividade promotora do VEGF (ver figura 14 a 16), levando a sugerir que o A14 possa estar envolvido não só na inibição mas também na transcrição de VEGF.

O aumento da proliferação e endotelial (expressa por VEGF) e a diminuição da apoptose (expressa por PCNA) são resultados da ação do fator indutor-hipóxia (HIF-1) que ativa a produção de VEGF, PDGF- β , óxido nítrico e endotelina, os quais atuam promovendo os mecanismos angiogênicos (KUPHAL, 2010; SEMENZA, 2004). Confirmando os nossos resultados mostrados nas figuras 8 e 16.

A hipóxia é uma condição comum encontrada em uma grande variedade de tumores sólidos e é frequentemente associado com um mau prognóstico. A hipóxia aumenta a glicólise tumoral, angiogênese e a

sobrevida a região afetada, bem como a invasão e metástase através da ativação de genes, tal como o HIF. O HIF-1 é mediado, portanto, por alterações na concentração de oxigênio tecidual, comumente visto em melanoma (ADAMS, 2006).

O HIF é um heterodímero que consiste de duas subunidades (HIF-1 α ; HIF-1 β), e sua expressão é altamente controlada (SEMENZA, 2003). Em condições normais, HIF-1 α é rapidamente degradado pela via ubiquitina-proteassoma. Essa ubiquitinação é regulada pela proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (VHL), cuja ação é bloqueada quando existe pouco oxigênio. Em situações de hipóxia, ocorre a translocação do complexo HIF-1(HIF-1 α ; HIF-1 β) para o núcleo, onde se liga a elementos genéticos de resposta a hipóxia, promovendo a transcrição de diversos genes incluindo o VEGF. Sabe-se que a expressão localizada de VEGF é o principal fator promotor do desenvolvimento de novos vasos em situação de hipóxia (LU, 2010; SINGH, 2008; ZHANG, 2007; KE, 2006).

O HIF se mostrou super expresso em tumores angiogênicos e em outros tipos de tumores (SINGH, 2008; SEMENZA, 2004). No entanto, para que haja novos vasos e sejam totalmente funcionais é necessária a expressão de outros genes, também induzidos pela hipóxia (KUPHAL, 2010; ZHANG, 2007).

O HIF-1 tem se mostrado possuir papel fundamental na angiogênese tumoral, no metabolismo da glicose, invasão/metástase e importante na resposta a radiação e quimioterapia (LU, 2010).

Um estudo recente imunoistoquímico analisou a expressão do HIF e de VEGF como marcador de hipóxia em amostras de focos primários e metastáticos: uma maior expressão de VEGF e HIF-1 foi observada em metástases pulmonares, mostrando uma possível correlação com o prognóstico e a resposta à quimioterapia a estes pacientes (ROSSI, 2010).

Estudos recentes mostram que cada etapa do processo de metástase, a partir da inicial de transição epitelial-mesenquimal à

colonização final, pode vir a ser regulado pela hipóxia, sugerindo um papel regulador mestre de hipóxia e HIFs em metástase. Além disso, a modulação de células-tronco do câncer de auto-renovação pelo HIF também podem contribuir para o programa de metástase hipóxia regulamentado. Várias abordagens para inibir a hipóxia, incluindo inibidores e redutores da HIF por drogas, e terapias genéticas podem tornar os tratamentos mais eficazes para prevenir ou reduzir a metástase. (KE, 2006; LU, 2010)

O efeito do A14 mostrou ser um bom agente antitumoral, comprovado por uma diminuição da proliferação, observada pela redução da marcação por PCNA, aumento da apoptose na marcação por Caspase-3, e inibição da angiogênese observada pela expressão de CD31 e VEGF. O A14 levou a uma redução significativa na expressão de HIF-1 α , e estando diretamente relacionado com a expressão de VEGF, pelas células B16F10.

6 CONCLUSÃO

O A14 demonstrou *in vivo* ser um potente agente antiproliferativo, apoptótico e antiangiogênico, em que foi analisado pelo modelo alogênico de implantação de células B16F10, sem demonstrar qualquer efeito tóxico nos camundongos. A diminuição da expressão de HIF-1 α *in vivo*, parece ser o principal mecanismo de ação do A14. Expressamos a necessidade de novas pesquisas utilizando o A14 a fim de elucidar o uso clínico em humanos.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, A.E.; CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P.A. Oxygen deprivation provokes melanoma. **Nat Med**. v. 12, n. 2, p. 168-9. 2006.

AMERICAN CANCER SOCIETY – Statistics for 2010. Cancer facts and figures 2010. Disponível em: http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_O.asp, Acesso em janeiro 2011.

ANDERSEN, M. L., D'ALMEIDA, V., KO, G.M., KAWAKAMI, R., MARTINS, P. J. F., MAGALHÃES, L.E., et al. Ethical and practical principles of the use of laboratory animals. **UNIFESP**. 2004.

ANDRADE, D.; ROSENBLATT, J. Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion. **Apoptosis**. 2011.

AUTIER, P.; DORÉ, J.F.; NÉGRIER, S.; LIÉNARD, D.; PANIZZON, R.; LEJEUNE F.J.; GUGGISBERG, D.; EGGERMONT, A.M.M. Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 15, p. 1304-9. 1999.

BAKOS, L. Melanoma cutâneo: estudos de base populacional no Brasil. **An. Bras. Dermatol** v. 81, n. 5, p 402. 2006.

BEN-IZHAK, O.; BAR-CHANA, M.; SUSSMAN, L.; DOBINER, V.; SANDBANK, J.; CAGNANO M.; COHEN, H.; SABO, E. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. **Histopathology**. v. 41, n. 6, p. 519-25. 2002.

BERWICK, M. Epidemiology: current trends, risk factors, and environmental concerns. In: Balch, C.M.; Houghton, A.N.; Souber, A.J.; Soong, S. – **Cutan melanoma**. Saint Louis, Quality Medical Publishing, p.5551-72. 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de assistência à saúde. Instituto nacional de câncer (INCa). **Coordenação de programas de controle de câncer (Pro-Onco)**. – Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. Rio de Janeiro, Ministério da saúde, v. 2. 1995.

BUSCA, R.; BALLOTT, I. R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. **Pigment Cell Res**, v. 13, p. 60–9. 2000.

- BUZAID, A.C.; MURREN, J. Chemotherapy for advanced malignant melanoma. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 21, p. 205-9, 1992.
- COHEN, S.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. **Phytochemistry**, v. 70, n.13-4, p. 1600-9. 2009.
- DEL BELLO, B.; VALENTINI, M.A.; COMPORTI, M.; MAELLARO, E. Cisplatin-induced apoptosis in melanoma cells: role of caspase-3 and caspase-7 in Apaf-1 proteolytic cleavage and in execution of the degradative phases. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1010, p. 200-4. 2003.
- 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, p. 675-85. 1962.
- DENKLER, K.; JOHNSON, J. A Lost Piece of Melanoma History. **Plastic Reconstr Surg.** v. 104, n. 7, p. 2149-53. 1999.
- DONG Y, CAO J, WANG H, ZHANG J, ZHU Z, BAI R, HAO H, HE X, FAN R, DONG C. Nitric oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to alpha-melanocyte-stimulating hormone by up-regulating melanocortin-1 receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 4, p. 849-53. 2010.
- ELDER, D. E. Prognostic models for melanoma. **J Cutan Pathol**, v. 37, p. 68-75. 2010.
- EVANS, G.R.D.; MANSON, P.N. Review and current perspectives of cutaneous malignant melanoma. **J. Am. Col. Surg**, v. 178, p. 523-40. 1994.
- FAVERO, G.M.; OTUKI, M. F.; OLIVEIRA, K.A.; BOHATCH JR, M.S.; BORELLI, P.; BARROS, F.B.; MARIA, D.A.; FERNANDES, D.; BYDLOWSKI, S.P. Simvastatin impairs murine melanoma growth. **Lipids in Health and Disease**. v. 9, n. 142. 2010.
- FELDMAN, P.J.; GOLDWASSER, R.; MARK, S.; SCHWARTZ, J.; ORION, I. A mathematical model for tumor volume evaluation using two-dimensions. **Journal of Applied Quantitative Methods**. v. 4, n. 4. 2009.
- FINGRUT, O.; FLESCHER, E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. **Leukemia**, v. 164, p. 608-16. 2002.
- FINGRUT, O.; REISCHER, D.; ROTEM, R.; GOLDIN, N.; ALTBOUM, I.; ZAN-BAR, I.; FLESCHER, E. Jasmonates induce nonapoptotic death in high-resistance mutant p53-expressing B-lymphoma cells, **Brit. J. Pharmacol**, v. 146, p. 800-8. 2005.

FLORELL, S.R.; BOWEN, A.R.; HANKS, A.N.; MURPHY, K.J.; GROSSMAN, D. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in a spectrum of melanocytic nevi. **J Cutan Pathol**, v. 32, n. 1, p. 45-9. 2005.

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 7, p. 643-51. 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) – FDA approves new treatment for a type of late-stage skin cancer. Disponível em: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm1193237.htm>. Acessado em abril de 2011.

FRESHNEY, R.I. Cell line provenance. **Cytotechnology**, v. 39, p. 3–15. 2002.

GARBE, C. Cutaneous melanoma: baseline and ongoing laboratory evaluation. **Dermatol. Ther**, v. 18, p. 413-21, 2005.

GARCIA, S. B.; BARROS, L.T.C.; TURATT, A; MARTINELO, F; MODIANO, P.; RIBEIRO-SILVA, A.; VESPÚCIO, M.V.O.; UYEMURA, S.A. The anti-obesity agent Orlistat is associated to increase in colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. **Cancer Letters**, v. 21, p. 31-34. 2006.

HEYFETS, A.; FLESCHER, E. Cooperative cytotoxicity of methyl jasmonate with anti-cancer drugs and 2-deoxy-D-glucose. **Cancer Lett**, v. 250, n. 2, p. 300-10. 2007.

HISAMATSU, Y.; NOBUHARU, G.; HASEGAWA, K.; SHIGEMORI, H. Senescence-promoting effect of Arabidopsis A. **Z Naturforsch**, v. 61, n. 5-6, p. 363-6. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) – Estimativa 2010 e 2011: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>. Acessado em janeiro de 2011.

JIANG, G.; ZHAO, J.; XIAO, X.; TAO, D.; GU, C.; TONG, Q.; LUO, B; WANG, L.; ZENG, F. AN N-terminal Smac peptide sensitizes human prostate carcinoma cells to methyl jasmonate-induced apoptosis. **Cancer Lett**, v. 302, n. 1 p. 37-46. 2011.

JUNQUEIRA Jr., G. Modelo experimental de metastases pulmonares de melanoma murino B16F10 em camundongos C57BL/6N com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico. **Tese de Doutorado**. UFRGS. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia, 2005.

JUNQUEIRA JR., G.; BRAGA, L.M.G.M.; MOTTA, M.S.; PILLA, H.S. Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **An. Bras. Dermatol**, v. 72, n. 5, p. 487-9. 1997.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol**, v. 70, n. 5, p. 1469-80. 2006.

KIRKWOOD, J.M.; IBRAHIM, J.; LAWSON, D.H.; ATKINS, M.B.; AGARWALA, S.S.; COLLINS, K.; MASCARI, R.; MORRISSEY, D.M.; CHAPMAN, P.B. High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the Multicenter Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E2696. **J.Clin. Oncol**, v. 19, p. 1430-6. 2001.

KLUG, H.L.P.; TOOZE, J.A.; GRAFF-CHERRY, C.; ANVER, M.R.; NOONAN, F.P.; FEARS, T.R.; TUCKER, M.A.; DE FABO, E.C.; MERLINO, G. Sunscreen prevention of melanoma in man and mouse. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 23, p. 835-7. 2010.

KOH, H.K. Cutaneous melanoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 171-82. 1991.

KONG, Y.; KUMAR, S.M.; XU, X. Molecular Pathogenesis of Sporadic Melanoma and Melanoma-Initiating Cells. **Arch Pathol Lab Med**, v. 134, p. 1740-49. 2010.

KUPHAL, S.; WINKLMEIER, A.; WARNECKE, C.; BOSSERHOFF, A.K. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 6, p. 1159-69. 2010.

LAKHANI, S.; SELBY, P.; BLISS, J.M. Chemotherapy for malignant melanoma: combinations and high doses produce more responses without survival benefit. **Br. J. Cancer**, v. 61, p. 330-34. 1990.

LAWRENCE, K.A.; SUSAN, J.B.; PHILIP, K.B.; PRESTON, V.D.; DOUGLAS, A.D.; FALING, J.L.; EUGENE, P.F.; GLEN, O.G.; ROBERT, A.H.; GERALD, L.M.; EDWINA, A.M.; FRED, P.; ROSSI, G.V.; PAUL, H.T. Manual Merck. Disponível em <<http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/corporate/index.html>>, Acessado em 17 de novembro de 2010.

LAZAR-MOLNAR, E.; HEGYESI, H.; TOTH, S.; FALUS, A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. **Cytokine**, v. 12, p. 547-54. 2000.

LEDEZMA, E.; APITZ-CASTRO, R.; CARDIER, J. Apoptotic and anti-adhesion effect of ajoene, a garlic derived compound, on the murine melanoma B16F10 cells: possible role of caspase-3 and the alpha(4)beta(1) integrin. **Cancer Lett**, v. 206, n. 1, p. 35-41. 2004.

LEE, M.I.; TOMSU, K.; VON ESCHEN, K.B. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Res**. v. 83, 81-92. 2000.

LEE, M.N.; LEE, S.N.; KIM, S.H.; KIM, B.; JUNG, B.K.; SEO, J.H.; PARK, J.H.; CHOI, J.H.; YIM, S.H.; LEE, M.R.; PARK, J.G.; YOO, J.Y.; KIM, J.H.; LEE, S.T.; KIM,

H.M.; RYEOM, S.; KIM, K.W.; OH, G.T. Roles of arrest-defective protein 1(225) and hypoxia-inducible factor 1alpha in tumor growth and metastasis. **J Natl Cancer Inst.** v. 102, n. 6, p. 426-42. 2010.

LEE, P.Y.; WONG, K.K. Nanomedicine: A New Frontier in Cancer Therapeutics. **Curr Drug Deliv.** 2011.

LINOS, E.; SWETTER, S.M.; COCKBURN, M.G.; COLDITZ, G.A.; CLARKE, C.A. Increasing burden of melanoma in the United States. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 7, p. 1666-74. 2009.

LU, X.; KANG, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 24, p. 5928-35. 2010.

MACKIE, R. Melanoma incidence in the west of Scotland over 25 years. In: 6th World Congress on Melanoma – **Book of abstracts**, p. 50. 2005.

MANOLA, J.; ATKINS, M.; IBRANHIM, J.; KIRKWOOD, J.M. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 3782-93. 2000.

McGOVERN, V.J. Melanoblastoma. **Med. J. Aust.**, v. 1, p. 139. 1952.

McGOVERN, V.J. Melanoma: Growth Patterns, Multiplicity and Regression. Paper presented at the **International Cancer Conference**, Sydney, 1972.

MELNIKOVA, V.O.; MENASHE, B. Inflammation and melanoma metastasis. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 22, p. 257-267, 2009.

MEYERS, M.L.; BALCH, C.M. Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. In: Malch, C.M.; Houghton, A.N.; Souber, A.J.; Soong, S. **Cutan melan**, Saint Louis, Quality Medical Publishing, p. 325-72. 1998.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MIOT, L.D.B.; MIOT, H.A.; SILVA, M.G.; MARQUES, M.E.A. Fisiopatologia do melasma. **An. Bras. Dermatol**, v. 84, n. 6. 2009.

MOORE, R.; GLOKLER, J.; WERNER, M. Nanotechnology and therapeutic delivery. **Report Nano Delivery**, v. 1, p. 1-34. 2010.

MUELLER, M.J.; MÈNE-SAFFRANE, L.; GRUN, C.; KARG, K.; FARMER, E.E. Oxylipin analysis methods. **Plant J**, v. 45, p. 472-89. 2006.

NYS, K.; MAES, H.; DUDEK, A.M.; AGOSTINIS, P. Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1 α in skin carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**. v. 1816, n.1, p. 1-12. 2011.

OHTA, S.; IMAIZUMI, Y.; OKADA, Y.; AKAMATSU, W.; KUWAHARA, R.; OHYAMA, M.; AMAGAI, M.; MATSUZAKI, Y.; YAMANAKA, S.; OKANO, H.; KAWAKAMI, Y. Generation of Human Melanocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1. 2011.

PEREIRA LOPES, J.E.; BARBOSA, M.R.; STELLA, C.N.; SANTOS, W.A.; PEREIRA, E.M.; NOGUEIRA-NETO, J.; AUGUSTO, E.M.; SILVA, L.V.; SMAILI, S.S.; GOMES, L.F. In vivo anti-angiogenic effects further support the promise of the antineoplastic activity of methyl jasmonate. **Braz J Biol**. v. 70, n. 2, p. 443-9. 2010.

PEREIRA LOPES, J.E.F. Efeito de metildihidroxijsmonato sobre o crescimento tumoral e a angiogênese em modelos experimentais “in vitro” e “in vivo”: estudo de formulação em nanopartículas lipídicas. **Tese de doutorado**, USP. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2009.

PETRESCU, I.; CONDREA, C.; ALEXANDRU, A.; DUMITRESCU, D.; SIMION, G.; SEVERIN, E.; ALBU, C.; ALBU, D. Diagnosis and treatment protocols of cutaneous melanoma: latest approach 2010. **Chirurgia**, v. 105, p. 637-643. 2010.

PISACANE, A.M.; PICCIOTTO, F.; RISIO, M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. **Cell Oncol**, v. 29, n. 1, p. 59-66. 2007.

RAK, J.; MILSOM, C.; YU, J. Vascular determinants of cancer stem cell dormancy—do age and coagulation system play a role? **APMIS**, v. 116, p. 660–76. 2008.

ROCHA, F.P.; MENEZES, A.M.; ALMEIDA, H.L. JR.; TOMASI, E. Sensitivity and specificity of screening cutaneous pre-malignant and malignant lesions. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 1. 2002.

ROSSI, B.; SCHINZARI, G.; MACCAURO, G.; SCARAMUZZO, L.; SIGNORELLI, D.; ROSA, M.A.; FABBRICIANI, C.; CARLO, B. Neoadjuvant multidrug chemotherapy including high-dose methotrexate modifies VEGF expression in osteosarcoma: an immunohistochemical analysis. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 11, n. 34. p.1-10 2010.

ROTEM, R.; HEYFETS, A.; FINGRUT, O.; BLICKSTEIN, D.; SHAKLAI, M.; FLESCHER, E. Jasmonates: Novel Anticancer Agents Acting Directly and Selectively on Human Cancer Cell Mitochondria. **Cancer Res**, v. 65, n. 5, p. 1984-93. 2005.

Schmelz

SEMBDNER, G.; ATZORN, R.; SCHNEIDER, G. Plant hormone conjugation. **Plant Mol Biol.** v. 26, n. 5, p. 1459-81. 1994.

SEMENZA, G.L. Targeting HIF – 1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 10, p. 721-32. 2003.

SEO, S.H.; KIM, K.S.; PARK, S.H.; SUH, Y.S.; KIM, S.J.; JEUN, S.S.; SUNG, Y.C. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. **Gene Ther.** p. 1-8. 2011.

SERIN, G.; DOĞANAVŞARGIL, B.; CALIŞKAN, C.; AKALIN, T.; SEZAK, M.; TUNÇYÜREK, M. Colonic malignant melanoma, primary or metastatic? Case report. **Turk J Gastroenterol.** v. 21, n. 1, p. 45-9. 2010.

SINGH, R.P.; GU, M.; AGARWAL, R. Silibinin inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and angiogenesis. **Cancer Res.** v. 68, n. 6, p. 2043-50. 2008.

SMALLEY, K.; EISEN, T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)–induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. **FEBS Lett**, v. 476, p. 198–202. 2000.

SOUZA, S.R.P.; FISCHER, F.M.; SOUZA, J.M.P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. **Rev Saúde Pública.** v. 38, n. 4, p. 588-98. 2004.

STREIT, M.; DETMAR, M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. **Oncogene.** v. 22, n. 20 p. 3172-9. 2003.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The biology of melanocytes. **Vet Dermatol**, v. 14, p. 57–65. 2003.

TAN, T.T.; COUSSENS, L.M. Humoral immunity, inflammation and cancer. **Curr Opin Immunology.** v. 19, n. 2, p. 209-16. 2007.

THODY, A.J. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 885, p. 217-29. 1999.

TRUCK, B.A.; HOTA, C.; WILSON, S.M.; CHAMBERS, F.A. Oteospontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. **Oncogene**, v. 22, p. 1198–1205. 2003.

VOISEY, J.; CARROLL, L.; VAN DAAL, A. Melanocortins and their receptors and antagonists. **Curr Drug Targets**, v. 4, p. 586-97. 2003.

WAGNER, J.D.; GORDON, M.S.; CHUANG, T.Y.; COLEMAN, J.J. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plast Reconstr. Surg.**, v. 105, p. 1774-99. 2000.

WASTERNAK, C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Ann Botany**, v. 100, p. 681-97. 2007.

WELLBROCK, C.; HURLSTONE, A. BRAF as therapeutic target in melanoma. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 5, p. 561-7. 2010.

WOO, D. K.; EIDE, M. J. Tanning beds, skin cancer, and vitamin D: an examination of the scientific evidence and public health implications. **Dermatol Ther**, v. 23, p. 61-71. 2010.

WU, Y.; ZHAO, R. C. H.; TREDGET, E. E. Concise Review: Bone Marrow-Derived Stem/Progenitor Cells in Cutaneous Repair and Regeneration. **Stem cells**, v. 28, p. 905-915. 2010.

YERUVA, L.; ELEGBEDE, J.A.; CARPER, S.W. Methyl jasmonate decreases membrane fluidity and induces apoptosis through tumor necrosis factor receptor 1 in breast cancer cells. **Anticancer Drugs**. v. 19, p. 766-76. 2008a.

YERUVA, L.; PIERRE, K.J.; BATHINA, M.; ELEGBEDE, A.; CARPER, S.W.; Delayed cytotoxic effects of methyl jasmonate and cis-jasmone induced apoptosis in prostate cancer cells. **Cancer Invest**. v. 26, p. 890-99. 2008b.

YOUNG, A.R.; POTTEN, C.S.; NIKAIDO, O.; PARSONS, P.G.; BOENDERS, J.; RAMSDEN, J.M.; CHADWICK, C.A. Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers. **J Invest Dermatol**, v.111, p. 936-40. 1999.

ZHANG, H.; GAO, P.; FUKUDA, R.; KUMAR, G.; KRISHNAMACHARY, B.; ZELLER, K.I.; DANG, C.V.; SEMENZA, G.L. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. **Cancer Cell**. v. 11, n. 5, p. 407-20. 2007.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 189/2010, sobre o projeto intitulado *“Influência do Metil Jasmonato nas fases de iniciação química de câncer de cólon e terapêutica por inoculação de células B16F10 e Caco-2”*, sob a responsabilidade do Professor Doutor Sérgio Brito Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de fevereiro de 2011.

(We certify that the protocol nº 189/2010, about *“Influence of Methyl Jasmonate on the stages of chemical initiation of colon cancer and therapeutic by inoculation of B16F10 and Caco-2”*, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 02/28/2011.

Ribeirão Preto, 28 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Netto
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal