

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JEAN CARLOS FERNANDO BESSON

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E TECIDUAL  
DO METIL JASMONATO (MeJA) NA COLITE EXPERIMENTAL EM RATOS.

Maringá

2018

JEAN CARLOS FERNANDO BESSON

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E TECIDUAL  
DO METIL JASMONATO (MeJA) NA COLITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali.

Coorientador: Profa. Dra. Graciette Matioli.

Maringá  
Junho – 2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

B559a Besson, Jean Carlos Fernando  
Avaliação da resposta anti-inflamatória,  
antioxidante e tecidual do metil jasmonato (MeJA) na  
colite experimental em ratos / Jean Carlos Fernando  
Besson. -- Maringá, 2018.  
87 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dr. Maria Raquel Marçal  
Natali.

Coorientadora: Profa. Dra. Graciette Matioli.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Metil  
Jasmonato (MeJA). 3. Colite experimental. I. Natali,  
Maria Raquel Marçal, orient. II. Matioli,  
Graciette, coorient. III. Universidade Estadual de  
Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 21.ed.616.34

Elaine Cristina Soares Lira - CRB 1202/9

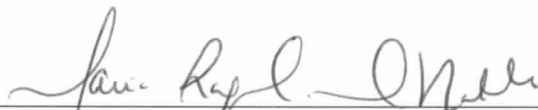
JEAN CARLOS FERNANDO BESSON

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E TECIDUAL DO METIL JASMONATO (MeJA) EM MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 25/06/2018.

**BANCA EXAMINADORA**



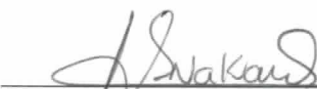
Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá



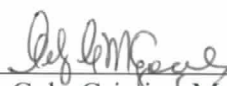
Profa. Dra. Naianne Kelly Clebis  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Prof. Dr. Bruno Ambrósio da Rocha  
Centro Universitário de Adamantina



Profa. Dra. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi  
Universidade Estadual de Maringá.



Profa. Dra. Cely Cristina Martins Gonçalves  
Universidade Estadual de Maringá

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar sou grato a Deus por ter me guiado durante toda a minha vida, por ter me concedido saúde, inteligência.

Aos meus queridos pais Pedro Besson e Rosilene Besson os quais por vezes se sacrificaram para que eu me mantivesse firme nos estudos e por insistirem quando eu pensei em desistir, sempre me oferecendo suas palavras de entusiasmo e muito carinho.

A minha estimada orientadora Dra. Maria Raquel Marçal Natali que aceitou orientar, acreditou no potencial do nosso trabalho e sempre me apoiou incondicionalmente durante estes quatro anos e meio de parceria e trabalho. Graças a essa oportunidade e confiança em meu trabalho, eu consegui evoluir profissionalmente e pessoalmente. Foram várias etapas, vários momentos, alguns problemas, muita ansiedade da minha parte e muita compreensão de e paciência de sua parte. Creio que me sinto mais preparado e confiante, pois consegui atingir todos os meus objetivos graças as suas contribuições resultando neste trabalho tão precioso e especial, **MUITO OBRIGADO!** Você é um exemplo de ser humano, guardarei com um apreço imenso nossos momentos de trabalho e alegrias. Sei que nossa parceria profissional não se encerra aqui, será para sempre.

A minha prezada coorientadora Graciette Matioli que foi a primeira pessoa a me dizer um sim na UEM quando fui aprovado no mestrado e ainda não tinha “nada definido” sobre meu futuro. Ela abriu as portas de seu laboratório e graças a esta oportunidade eu pude realizar meu mestrado e aprender muito durante o período de convivência, **MUITO OBRIGADO!**

Gostaria de agradecer também a professora Luzmarina Hernandes que desde o mestrado sempre se mostrou muito paciente e amiga. Criei um vínculo muito especial e devo isso a nossa parceria iniciada no mestrado. Sei que sempre poderei contar com você... **MUITO OBRIGADO!**

As técnicas (três Marias) Maria Euride Carlos Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Maria Ângela Moreira da Costa por cuidarem incondicionalmente do laboratório de histologia, por oferecerem o seu melhor profissionalmente e por oferecer também um ‘colo de mãe’ para consolar todos os seus “filhos científicos” nos momentos de desespero, **MUITO OBRIGADO!**

A professora Ciomar Aparecida Bersani-Amado por todo o apoio nos experimentos referentes à inflamação realizados em seu laboratório. Em especial ao meu querido amigo Bruno Ambrósio que me auxiliou em todos os momentos, compartilhando várias técnicas, vários “macetes” para minimizar os erros, frequentei o laboratório de inflamação por um ano e meio e só tenho a agradecer, conto com você em novos projetos. Inclusive aos técnicos Jailson e Celinha por todo o suporte e auxílio durante os experimentos.

Aos professores Adelar Bracht, Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi e Jurandir Fernando Comar por todo o apoio nos experimentos referentes ao estresse oxidativo realizados. Anacharis, foi um enorme prazer compartilhar vários experimentos e discussões com você, agradeço toda a paciência e cuidado durante quase sete meses de convivência semanalmente, foram muitos e muitos experimentos, frustrações e alegrias... Eu devo todo o sucesso das técnicas e dos resultados de estresse oxidativo aos seus ensinamentos. Sua experiência, sua técnica e sua amizade foram muito importantes, espero poder trabalhar com você novamente em projetos futuros.

As técnicas Elizete, Valéria e Márcia do laboratório de fisiologia da UEM que sempre foram prestativas em prestar auxiliam na realização de muitas das técnicas realizadas neste trabalho.

Ao professor Paulo César de Freitas Mathias e a todos os amigos do laboratório de Biologia Celular da Secreção. Pude trabalhar diretamente com o Professor Paulo, participar de inúmeros eventos, viagens, projetos e tenho uma grande admiração e respeito pelo seu trabalho, além disso, uma amizade muito especial que consolidamos ao longo destes anos.

Aos professores: Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello, Dra. Fernanda Losi, Dra. Maria de Montserrat Dias Pedrosa, Dra. Nilza Cristina Buttow, Dr. Sidney Peres, Dra. Vilma Godoi, pela amizade e parceria na contribuição deste trabalho.

Aos meus queridos co-orientandos, os quais trabalharam diretamente sob minha orientação durante um ou dois anos e contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho Bruna Cordeiro, João Felipe Feldmann, João Henrique Feldmann, Leonardo Beni e Paulo Sérgio Costa, **MUITO OBRIGADO!**

Aos meus amigos que estiveram comigo em diversos momentos durante o desenvolvimento deste trabalho na sala 105 e no laboratório de Histotécnica Animal no período de 2014/2017: Ana Paula Rampazzo, Carlos Rosa, Débora Rissato, Débora Weber, Evandro Beraldi, Fernanda Bueno, Fernando Vicentini Fernanda, Jéssica Campos, Larissa Schneider, Lia Mara Tiron, Rodrigo Mello Gomes, Stephanie Borges entre outros tantos não citados, aos quais peço perdão.

Aos meus queridos amigos que sempre estiveram do meu lado durante estes quatro anos de doutoramento: Ana Camila Prizon, Ananda Malta, Camila Lima, Caroline Picoli, Eloa Pastório, Giovane Ansanelo, Giselle Bueno, Gustavo Gilio, Laize Peron, Larissa Ciupa, Luiz Felipe Barella, Marcelo Correia, Rodrigo Vargas, Rosiane Miranda e Ulisses Oliveira.

A Universidade Estadual de Maringá pela estrutura que favoreceu o desenvolvimento deste trabalho e ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular PBC-UEM, onde tive a oportunidade de cursar o mestrado e o doutorado durante os anos de 2012/2018. Em especial aos secretários Érica e Nelsino por toda a dedicação e auxílio no desenvolvimento do meu doutoramento. Também gostaria de agradecer ao PBC pela oportunidade de ter realizado meu estágio de doutoramento sanduíche na Mayo Clinic – Minnesota – USA. Agradeço em especial ao Dr. David Robert Linden por ter aceitado me orientar e a Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni (DCM/UEM) por auxiliar neste processo.

Finalmente agradeço aos professores que aceitaram fazer parte da banca examinadora deste trabalho. Membros titulares: *Dra. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi* (Departamento de Bioquímica/UEM), *Dr. Bruno Ambrósio da Rocha* (Departamento de Medicina/UniFAI), *Dra. Cely Cristina Martins Gonçalves* (Departamento de Enfermagem/UEM) e *Dra. Naianne Kelly Clebis* (Departamento de Morfologia/UFRN), e os membros suplentes: *Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello* (Departamento de Ciências Morfológicas/UEM) e *Dr. Eduardo José de Almeida Araújo* (Departamento de Histologia/UEL).

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais Pedro e Rose Besson*



## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos. O primeiro artigo intitulado: “*Methyl jasmonate: a phytohormone with potential for treatment of inflammatory bowel diseases*”. O objetivo desta revisão foi explorar duas hipóteses propostas para explicar a ação do MeJA, fito-hormônio lipídico e seu mecanismo potencialmente anti-apoptótico para uso como alvo terapêutico para o futuro tratamento de DIIs que afetam o trato gastrointestinal, contribuindo para a restauração da barreira epitelial, para melhorar a qualidade do tecido intestinal. Este artigo de revisão foi publicado no periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, volume 70, número 2, pp. 178-190, 2018, fator de impacto: 2,405 (JCR-2016) e Qualis CAPES (Ciências Biológicas I): B1.

O segundo artigo intitulado “*Metil jasmonato: Um fito-hormônio com atividade anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetor com potencial terapêutico para a colite experimental*”, teve o objetivo de avaliar “potenciais efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, neuroprotetores e teciduais após o tratamento com metil jasmonato (MeJA) em modelo de colite experimental crônico durante vinte e oito dias. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, este artigo foi redigido de acordo com as normas do periódico (*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*), fator de impacto: 4,593 (JCR-2016) e Qualis CAPES (Ciências Biológicas I): A2.

*A resiliência de hoje é resultado da renitência de ontem.*

*Portanto desistir jamais...*

Iago Fernandes

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO** – As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) correspondem a alterações morfofisiológicas que podem afetar o trato gastrointestinal, estes distúrbios representam grave problema de saúde mundial. Em condições de normalidade, a apoptose no epitélio intestinal deve ocorrer de forma bem regulada, no entanto, em excesso, ela pode desencadear um processo inflamatório elevando o estresse oxidativo. Além de provocar alterações teciduais distintas como a deposição descontrolada de fibras colágenas, alterações nos plexos entéricos que em conjunto podem levar a cronificação de um processo inflamatório desencadeando a surgimento das DIIs. As plantas são capazes de produzir muitas substâncias voláteis a partir de seus tecidos, entre essas destacamos a família dos jasmonatos, importantes reguladores celulares envolvidos em diversos processos de desenvolvimento, atuando nos mecanismos de defesa das plantas em resposta a lesões ocasionadas por insetos ou outros tipos de patógenos, ou ainda, por alterações ocasionadas por estresse ambiental. O metil jasmonato (MeJA) tem sido caracterizado como um regulador celular vital envolvido em alguns processos dinâmicos, ligados ao desenvolvimento de respostas atuantes na defesa contra estresses bióticos e abióticos, se apresentando seletivamente tóxico para as células cancerígenas, não afetando células normais, induzindo a apoptose por vários mecanismos, propriedade que favorece o seu desenvolvimento na terapêutica tanto para o câncer, quanto para outras doenças.

**OBJETIVOS** – O objetivo deste estudo foi caracterizar e elencar hipóteses relacionadas a prováveis aplicações do MeJA como um novo candidato para o tratamento das DIIs, apresentando possíveis mecanismos reguladores da morte celular, modulando a expressão das principais classes de famílias que atuam nas vias extrínsecas e intrínsecas do processo apoptótico bem como avaliar em modelo de colite experimental a resposta tecidual, o potencial anti-inflamatório, neuroprotetor e antioxidante do tratamento com jasmonatos, especificamente com MeJA isolado ou complexado com ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CD) no colo distal de ratos com colite quimicamente induzida por TNBS.

**MÉTODOS** – Para o artigo de revisão bibliográfica sistemática e quantitativa, foram consultados vários artigos científicos entre os anos de 2014 e 2017 utilizando as seguintes palavras-chaves: MeJA, antioxidante, anti-inflamatório, anti-câncer, apoptose, caspase. A revisão foi organizada nos seguintes tópicos: resumo, introdução, patogênese das principais DIIs: sintomas clínicos; mediadores inflamatórios e câncer coloretal; a família dos jasmonatos e o metil jasmonato; apoptose intestinal; MeJA: um potencial fito-hormônio para a terapia

anti-TNF no tratamento de DIIs; MeJA: uma possível ação moduladora na produção de ROS e manutenção da apoptose intestinal e conclusão. O segundo artigo foi desenvolvido a partir do protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (protocolo nº 074/2014). Foram utilizados 35 ratos Wistar com aproximadamente 90 dias de idade, distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=7/grupo), discriminados de acordo com as soluções administradas e formas de tratamento, durante 28 dias. Para o estabelecimento da colite experimental e tratamento com MeJA, os animais receberam solução salina 0,9% ou solução TNBS/etanol via enema bem como tratamento diário via gavagem de MeJA (300 mg/kg) diluído em óleo de milho ou MeJA (300 mg/kg) complexado molecularmente com HP- $\beta$ -CD. Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma CC: animais controle que receberam dose única de solução salina (0,9%) via enema e ausência de tratamento; CJ: animais controle que receberam dose única de solução salina (0,9%) via enema e tratados com doses diárias de MeJA; TN: animais que receberam dose única de TNBS via enema e ausência de tratamento; TJ: animais que receberam dose única de TNBS via enema e tratados com doses diárias de MeJA; TC: animais que receberam dose única de TNBS e tratados com doses diárias de MeJA complexado com HP- $\beta$ -CD. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados e coletado sangue para análise de marcadores de injúria hepática. Posteriormente foram laparatomizados sendo coletadas amostras do colo distal destinadas a avaliação estereomicroscópica, processamento histológico para avaliação tecidual e imunofluorescência para identificação dos neurônios mioentéricos nitrérgicos. Parte das amostras foram clampeadas e fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -80°C para análises de marcadores inflamatórios (MPO, NO, IL-2, IL-17), pró e antioxidantes (CAT, GPx, GSH, GSSG, ROS, TBARS, XO).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – No modelo de colite proposto a instilação de TNBS por um período de 28 dias produziu inflamações na parede colônica gerando alterações morfoestruturais na arquitetura intestinal com características semelhantes as DIIs. A administração de MeJA na dose de escolha 300 mg/kg isolado ou complexado com CDs não induziu hepatotoxicidade nos animais. Os níveis expressos de MPO e IL-17 foram regulados negativamente e o nível de IL-2 foi regulado positivamente pelo MeJA isolado. Com relação à resposta tecidual, constatamos que o tratamento crônico com MeJA isolado impediu o desenvolvimento da fibrose colônica, pois manteve a área ocupada por fibras colágenas do tipo I e produção efetiva de fibras colágenas imaturas do tipo III, favorecendo o processo de reparo no tecido colônico. Verificamos também que administração de TNBS resultou em

aumento no número da subpopulação mioentérica nitrérgica (nNOS) sem efeito do MeJA complexado. O tratamento com MeJA isolado demonstrou potencial em manter a densidade da subpopulação neuronal nitrérgica comparado ao grupos não inflamados, garantindo o funcionamento dos plexos mioentéricos, contribuindo para a neuroproteção do SNE. Comprovamos a ação do MeJA sobre o estado oxidativo no modelo de colite experimental em ratos. A lipoperoxidação lipídica (LP) foi três vezes menor em relação ao grupo sem tratamento após a administração de MeJA isolado ou complexado, o qual ainda diminuiu a atividade de xantina-oxidase XO nos animais colíticos os quais apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle tratado com MeJA. O tratamento utilizando MeJA isolado demonstrou ação antioxidante mais eficiente que o MeJA complexado com CDs ao promover a redução de glutathiona oxidada (GSSG) e incrementar os níveis de glutathiona reduzida (GSH). O MeJA complexado apenas se mostrou mais eficiente que o MeJA isolado ao modular a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx). Com bases nestes resultados, o MeJA isolado apresenta-se como um novo alvo terapêutico para os tratamentos das DIIs. Os dados resultantes da revisão bibliográfica sistemática comprovam os resultados experimentais, pois o MeJA, apresenta possíveis mecanismos reguladores da morte celular, regulando a expressão das principais classes de famílias que atuam nas vias extrínsecas e intrínsecas do processo apoptótico, preservando as células que não normais, representando um nova alternativa referente nos processos de transdução de sinais importantes na renovação celular da mucosa intestinal, auxiliando no processo de ciclagem celular de células transformadas, por vias apoptóticas nas DIIs.

**CONCLUSÕES** – O MeJA representa um novo candidato para o tratamento das DIIs, apresentando possíveis mecanismos reguladores da morte celular, modulando a expressão das principais classes de famílias que atuam nas vias extrínsecas e intrínsecas do processo apoptótico, bem como apresenta comprovado potencial terapêutico na atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-fibrótica e neuroprotetora para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doenças inflamatórias intestinais, metil jasmonato e colite experimental.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION** - Intestinal inflammatory diseases (IBDs) correspond to morphophysiological alterations can affect the gastrointestinal tract, these disorders represent a serious health problem in several countries. In normal conditions, the intestinal epithelium's apoptosis should occur in a well-regulated way; however, in excess, it may trigger an inflammatory process by elevating oxidative stress. In addition to causing tissue changes such as the uncontrolled deposition of collagen fibers, as well some changes in the enteric plexus. This alterations together can lead to chronification and thus, the emergence of pathologies called IBDs. Plants are capable of producing many volatile substances from their tissues, among which we highlight the family of jasmonates as important cellular regulators involved in various developmental processes, acting on the defense mechanisms of the plant in response to injuries caused by insects or other types of pathogens, or due to changes caused by environmental stress. MeJA has been characterized as a vital cellular regulator involved in some dynamic processes, linked to the development of active responses in defense against biotic and abiotic stresses, being selectively toxic to cancer cells, not affecting normal cells, inducing apoptosis by various mechanisms , property that favors its development in the therapy for both cancer and other diseases.

**OBJECTIVES** - The objective of this study was to characterize and elicit hypotheses related to the MeJA's probable applications as a new candidate for the treatment of IBD. We presenting the possible mechanisms regulating cell death, modulating the expression of the main classes of apoptotic's caspases families, as well realize analysis of anti-inflammatory, antioxidant and tissue response of MeJA isolated or complexed with HP- $\beta$ -CD that in the distal colo of rats with colitis chemically induced by TNBS.

**METHODS** - To the systematic and quantitative literature review article, several scientific articles were consulted between 2014 and 2017 using the following keywords: MeJA, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, apoptosis, caspase. The review was organized into the following topics: summary, introduction, pathogenesis of the principals IBDs:clinical symptoms, inflammatory mediators and colorectal cancer, the Jasmonates family and methyl jasmonate, intestinal apoptosis, MeJA: a potential phytohormone for anti-TNF therapy in the treatment of IBDs, MeJA: the possible modulating actionof ROS production and maintenanceof intestinal apoptosis and conclusion. The second article was developed from the experimental protocol was approved by the Committee of Ethical

Conduct on the Use of Animals in Experimentation of the State University of Maringá (protocol number 074/2014). Thirty-five Wistar rats with approximately 90 days of age were randomly assigned to 5 experimental groups (n = 7/group), divided according to the solutions administered and treatment forms for 28 days. For the establishment of experimental colitis and MeJA treatment, the animals received 0.9% saline solution or TNBS / ethanol solution via enema as well as daily treatment via gavage of MeJA (300 mg / kg) diluted in corn oil or MeJA (300 mg / kg) complexed molecularly with HP- $\beta$ -CD. The experimental groups were distributed as follows: control animals receiving a single dose of saline (0.9%) via enema and no treatment; CJ: control animals receiving a single dose of saline solution (0.9%) via the enema and treated with daily doses of MeJA; TN: animals that received a single dose of TNBS via enema and no treatment; TJ: animals receiving a single dose of TNBS via enema and treated with daily doses of MeJA; TC: animals receiving single doses of TNBS and treated with daily doses of MeJA complexed with HP- $\beta$ -CD. After 28 days the animals were euthanized and blood was collected for analysis of markers of liver injury. Subsequent laparotomized specimens were collected from the distal neck for stereomicroscopy evaluation, histological processing for tissue evaluation and immunofluorescence for the identification of nitrergic myenteric neurons. Part of the samples were clamped and fixed in liquid nitrogen and stored at -80 ° C for analyzes of inflammatory markers (MPO, NO, IL-2 and IL-17), pro and antioxidants (CAT, GPx, GSH, GSSG, ROS, TBARS, XO).

**RESULTS AND DISCUSSION** - In the proposed colitis model the instillation of TNBS for a period of 28 days produced inflammations in the colonic wall generating morphostructural alterations in the intestinal architecture with similar characteristics of IBDs. Administration of MeJA at the dose of choice 300 mg / kg isolated or complexed with CDs did not induce hepatotoxicity in animals. We found that the expressed levels of MPO, IL-12 and IL-17 were down-regulated and the level of IL-2 was up-regulated by the MeJA isolated. Regarding the tissue response, we observed that the chronic treatment with MeJA isolated prevented the development of colonic fibrosis, since it maintained the area occupied by type I collagen fibers and effective production of type III immature collagen fibers, improving the tissue repair process colonic. We also found that administration of TNBS resulted in an increase in the number of the nitrergic myenteric subpopulation (nNOS) with no effect of the complexed MeJA. Treatment with MeJA isolated demonstrated potential in maintaining the density of nNOS subpopulation compared to non-inflamed groups, thus guaranteeing the functioning of the myenteric plexuses, contributing to the neuroprotection of the ENS. We evaluated the action of MeJA on oxidative status in the experimental colitis model in rats.

Lipidic peroxidation (LP) was three times lower in relation to the untreated group after administration of isolated or complexed MeJA, which also decreased xanthine-oxidase (XO) activity in the colitic animals, which presented similar results to the control group treated with MeJA . The treatment using MeJA isolated demonstrated a more efficient antioxidant action in comparison with MeJA complexed with CDs by promoting the reduction of oxidized glutathione (GSSG) and increasing the levels of reduced glutathione (GSH). The complexed MeJA was only more efficient than the isolated MeJA by modulating the activity of the glutathione peroxidase enzyme (GPx). Based on these results, the isolated MeJA represents a new therapeutic target for the treatments of IBDs. The data resulting from the systematic literature review confirm the experimental results, since the MeJA presents possible mechanisms of cell death regulating the expression of the main classes of families that act in the extrinsic and intrinsic pathways of the apoptotic process, preserving cells that are not normal, and thus may represent a new alternative in the processes of transduction of important signals in the cellular renewal of the intestinal mucosa, aiding in the process of cellular cycling of transformed cells by apoptotic pathways in the DIIs.

**CONCLUSIONS** – MeJA represents a new candidate for the treatment of IBD, presenting possible mechanisms of cell death, modulating the expression of the main classes of families that act in the extrinsic and intrinsic pathways of the apoptotic process, as well represent herapeutic potential in the antioxidant's, anti-inflammatory's, anti-fibrotic and neuroprotective activities for the treatment of inflammatory bowel diseases affecting thousands of people in the world.

**KEY-WORDS:** Inflammatory bowel diseases, methyl jasmonate and experimental colitis.



## **Artigo 1**

Foi publicada no periódico Journal of Pharmacy and Pharmacology (*Methyl jasmonate: a phytohormone with potential for treatment of inflammatory bowel diseases*), fator de impacto: 2,405 (JCR-2016) e Qualis CAPES (Ciências Biológicas I): B1.

# Methyl jasmonate: a phytohormone with potential for the treatment of inflammatory bowel diseases

Jean Carlos Fernando Besson<sup>a</sup>, Caroline de Carvalho Picoli<sup>b</sup>, Graciette Matioli<sup>c</sup> and Maria Raquel Marçal Natali<sup>d</sup> 

<sup>a</sup>Cellular and Molecular Biology, State University of Maringá, <sup>b</sup>Physiological Sciences, State University of Maringá, <sup>c</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics and <sup>d</sup>Department of Morphologic Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

## Keywords

apoptosis; inflammatory bowel disease; intestinal epithelial cells; methyl jasmonate; therapeutic target

## Correspondence

Maria Raquel Marçal Natali, Department of Morphologic Sciences, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil.  
E-mail: mrmnatali@gmail.com

Received February 9, 2017  
Accepted September 21, 2017

doi: 10.1111/jphp.12839

## Abstract

**Objectives** The phytohormone methyl jasmonate (MeJA) has been identified as a vital cell regulator in plants. This substance is analogous to eicosanoids and similar to that of anti-inflammatory prostaglandins. In animals and in animal cells, it displayed an efficient neuroprotective, anti-inflammatory and antioxidant action; while in tumoral strains, it demonstrates a potentially highly attractive mechanism of apoptosis induction through various cellular and molecular mechanisms. The aim of the present review was to explore two new hypotheses that explain the action of MeJA, a lipid phytohormone and its potentially anti-apoptotic mechanism for use as a therapeutic target for future treatment of Inflammatory bowel diseases (IBDs).

**Key findings** Methyl jasmonate is a new candidate for the treatment of IBDs, modulating the expression of the major classes of caspase-type protease families that selectively act on the extrinsic and intrinsic pathways of the apoptotic process. Its action is based on the reduction of the expression in tumour necrosis factor tissue levels and the modulating action of reactive oxygen species production, acting only on the destruction of cells that express the diseased phenotype, and preserving cells that are not transformed.

**Conclusions** Methyl jasmonate may represent an alternative for the transduction processes of important signals in the cellular renewal of the intestinal mucosa.

## Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs) comprise a number of chronic disorders that can affect the gastrointestinal tract. They include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), both of which represent a serious health problem in several countries. Their incidence and prevalence rates have increased globally, mainly due to lifestyle, smoking, diets that are high in fat and sugar, the use of certain drugs, stress and high socioeconomic levels. The highest incidence and prevalence of IBDs are found in populations in Northern Europe and North America; in contrast, the prevalence is lower in continental Asia, where UC is the most common form.<sup>[1–3]</sup>

In general, IBDs are characterized by recurrent chronic and inflammatory conditions in the digestive tract, with an unknown multifactorial aetiology. Clinical, experimental and genetic data suggest that dysfunction in the intestinal

mucosal barrier is an exclusive characteristic of IBDs. Restoration of the epithelial barrier homeostasis could be considered a therapeutics target to improve the health of intestinal tissue, as well as minimizing the impacts of inflammation in pathogenesis of intestinal diseases.<sup>[4,5]</sup>

The mucosa of the gastrointestinal tract consists of distinct cellular populations such as enterocytes and goblet cells, which act on the secretion of mucus, forming a layer that guarantees supplementary protection. This coating acts as a barrier for luminal antigens and, at the same time, allows the absorption of water and nutrients.<sup>[6]</sup> The regulation of the life cycle of mucosal epithelial cells varies with the period of the migration of these lineages from the site of origin in the base of the crypts to the ends of the villi to be eliminated for lumen opening.<sup>[7]</sup>

Immune system cells are also found in the lamina propria, where they act to protect against infection.<sup>[6]</sup> The mucosal T cells are a type of lymphocyte and play a central

role in cell-mediated immunity. These cells exhibit a type of phenotype characteristic of the activated effector cells, which act in the intestinal mucus via type 1 and 17 T helper cells (Th1 and Th17).<sup>[8,9]</sup>

In IBDs, the downregulation of the mucosal T cells contributes to a pathogenic state in CD and UC.<sup>[10]</sup> Apoptosis in the intestinal epithelium should occur in a highly orchestrated manner. When it takes place in excess, this process can augment monolayer permeability and reduce the function of the epithelial barrier. It can cause a type of inflammation, leading to chronification and the appearance of pathologies such as CD and UC.<sup>[10,11]</sup>

This study will discuss the specialized properties of mucosal T cells in the context of immune homeostasis, inflammation, oxidative stress and apoptosis. The delicate balance between immune activation and tolerance at the mucosal sites of the T cells is extremely important for maintaining the integrity of the mucosa.<sup>[10,12]</sup>

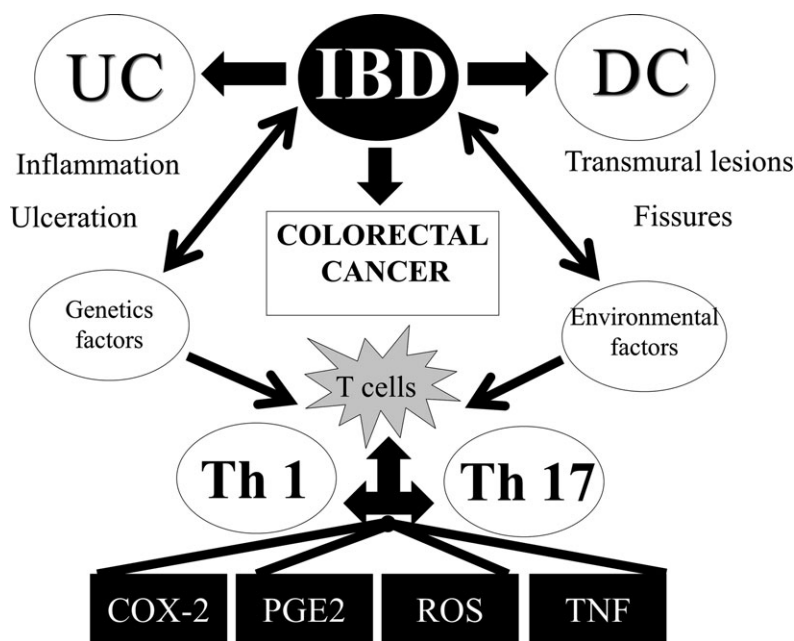
The objective of the present review was to explore two new hypotheses proposed to explain the action of MeJA, a lipid phytohormone and its potentially anti-apoptotic mechanism for use as therapeutic target for the future treatment of IBDs affecting the gastrointestinal tract,

contributing to the restoration of the epithelial barrier homeostasis to improve the health of the intestinal tissue.

### Pathogenesis of the principals IBDs: clinical symptoms, inflammatory mediators and colorectal cancer

The pathogenesis of IBDs is complex and intrinsically associated with a genetic predisposition. Yet, some dysfunctions related to the environment and/or the epithelial barrier can cause a persistent activation of the immune response of the intestinal mucosa.<sup>[6,13]</sup> At first, this aggressive immune response was attributed to pathogenesis, but the appearance of a primary defect in the innate intestinal immunity has been considered a new hypothesis for the pathogenic profile of IBDs.<sup>[6,14,15]</sup>

Although UC and CD are clinically similar, they are recognized as distinct diseases (Figure 1). Environmental factors may play a greater role in the pathogenesis of UC,<sup>[6,16]</sup> while genetic factors act more forcefully in the case of CD.<sup>[17]</sup> Clinically, inflammation in UC is continuously distributed in the mucosa and ulcers are restricted to the colon, whereas in CD the pathology is segmental, meaning



**Figure 1** Inflammatory bowel diseases are intimately related to the development of colorectal cancer. An imbalance between genetic and environmental factors results in the dysfunction of the colon epithelial cells and changes in the lamina itself, resulting in the activation and differentiation of healthy T cells for the expression of different cell phenotypes. T helper lymphocyte lines are altered to yield Th1 or Th17 lineages in the tissue microenvironment. Following this inflammatory cascade involving prostanoids derived from arachidonic acids such as COX-2 and PGE2 and proinflammatory cytokines such as tumour necrosis factor are activated. Inflammatory mediators also increase oxidative stress in the microenvironment, corroborating a pathogenic condition characteristic of inflammatory bowel disease. As local inflammation increases, genetic, environmental, oxidant and inflammatory factors are activated as molecular triggers that alter homeostasis, leading to a pathological state with remission and clinical manifestations. Inflammatory bowel diseases are manifested by two main diseases, with UC clinically characterized by ulcerative and inflammatory sites, and Crohn's disease presenting transmural lesions and fistulas distributed on the colon surface.

that it can affect any transmural region of the gastrointestinal tract.<sup>[18,19]</sup>

In UC, dysregulations of the immune response in individuals with a genetic predisposition, as well as other factors such as polymorphisms in the interleukin receptor gene and the action of other genes correlated with the inflammatory response, can modulate inflammation in the body and are recognized as the main cause of this disease.<sup>[18,19]</sup> The segmental-type lesions in CD, meanwhile, are well demarcated and have damaged areas between normal segments. Inflammation can penetrate the entire thickness of the intestinal wall, leading to the formation of deep fissures and the development of fistulas.<sup>[8]</sup>

The intestinal epithelium is highly polarized and has two discrete regions with one layer of connected cells, forming a columnar-like epithelium on the intestinal surface. The first layer is an apical surface facing the lumen and is specialized for absorption. The second, meanwhile, has a very important role in the immune defences of the bowel wall against hazardous bacteria present in the intestinal lumen. This basolateral surface is in contact with the immune compartment of the underlying lamina, forming two physical compartments that separate the outer lumen of the immune system from the internal host.<sup>[4,10]</sup>

In the epithelium, enterocytes are linked to the absorption of ions, nutrients, water, vitamins and are also related to the induction of immunological tolerance.<sup>[9]</sup> Goblet cells represent a lineage of cells scattered throughout the epithelium responsible for secretions like a protective mucus layer, being fundamental to the defence against microorganisms and aiding in the coordination of intestinal functions via hormonal secretions.<sup>[7,20]</sup>

The differentiation of Th cells into Th1, Th2 or Th17 effector type cell lines depends on the tissue microenvironment, which is generated by the dominant type of cytokines, together with other relevant mechanisms, leading to a cascade of molecular events. These include the time at which the antigen-presenting cell (APC) was activated and other factors that result in the activation of the phenotype to be developed, including antigen affinity and type, T cell receptor (TCR) signalling and the coreceptor signals.<sup>[21,22]</sup>

Previous data showed us that Th17 cells mainly work to achieve the induction of innate and adaptive host responses and contribute to the host defence against pathogens at mucosal sites.<sup>[22,23]</sup> Th1 can regulate the work of the neutrophils during the inflammatory process, promoting the re-establishing of the epithelial barrier and allowing a type of symbiotic relationship with the commensal microbiota present in this region, characterizing a dynamic profile in the control against possible invading pathogens.<sup>[22]</sup>

In patients with IBDs (CD and UC), high levels of arachidonic acid (AA) and its eicosanoid metabolites<sup>[24]</sup> were observed. Each type of eicosanoid (prostanoid,

leukotriene and hydroxyheicosatetraenoic acid) preferably recognizes one or more receptors coupled to one or more signal transduction processes. Modifications in these receptors of the intestinal epithelium alter the control of the processes of proliferation, differentiation and apoptosis, contributing to the development of IBD and colorectal cancer (CRC).<sup>[25]</sup>

The importance of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways and consequent eicosanoid synthesis for the physiology and pathophysiology of the intestinal epithelium is currently being established.<sup>[25]</sup> However, previous studies have shown that the production of prostanoids, specifically COX-2, is increased in the affected areas in the colonic epithelium.<sup>[26]</sup> In addition to COX-2, increased prostaglandin E2 (PGE2) contributes to the inflammatory development of T cells with altered phenotypes, favouring the production of Th1 and Th17 proinflammatory lines.<sup>[24]</sup>

Alterations in the intestinal epithelial barrier modify the control of the immune response, stopping intestinal absorption and secretion and altering epithelial homeostasis, during which it may cause the development of IBDs and colorectal cancer (CRC).<sup>[25]</sup> In this sense, the association of COX-2 and PGE-2 with other proinflammatory mediators such as TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B, TGF $\beta$  contributes significantly to the development of colorectal cancer in patients with IBD.<sup>[27]</sup>

The disturbance in intestinal homeostasis leads to the development and perpetuation of the inflammatory cascade in IBD.<sup>[28]</sup> As inflammation is related to the formation of reactive intermediates such as reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), oxidative stress has been proposed as a mechanism that underlies the pathophysiology of IBD. Much evidence suggests that IBD is associated with an imbalance between increased ROS and decreased antioxidant activity, expressing clinical pathophysiological features in both CD and UC patients.<sup>[28,29]</sup>

## The Jasmonates family and methyl jasmonate

Jasmonates are important cell regulators that are involved in a number of processes in plant growth, and act in defence mechanisms in response to injuries caused by insects or other pathogens or by environmental stress.<sup>[30]</sup> They activate an intra-cellular signalling mechanism as a defence in response to damage caused by environmental injuries or aggression, such as ultraviolet radiation and osmotic shock.<sup>[31,32]</sup>

The jasmonate family comprises three classes of constituents: *Cis-jasmone* (CJ), *Jasmonic acid* (JA) and *Methyl Jasmonate* (MeJA), which are abundantly distributed in all plants and regulate various processes of growth and adaptation to the environment.<sup>[31]</sup> MeJA is a derivative of

jasmonic acid (JA), formed from an enzymatic methylation pathway, involving the action of the carboxyl methyltransferase enzyme (CMT).<sup>[30]</sup>

In 1962, a compound with the characteristics of Jasmonic Acid Methyl Ester (JAME) was isolated for the first time from the essential oil of jasmine (*Jasminum grandiflorum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*).<sup>[33–35]</sup> Nine years later, JA was isolated from the culture of the *Lasiodiplodia theobromae* fungus.<sup>[36]</sup> The characterization of the first physiological effects of free JA isolated from JAME began in 1980, with studies related to senescence and the role of growth inhibitors.<sup>[37,38]</sup>

Jasmonates are oxygenated fatty acids derived from linolenic acid.<sup>[39]</sup> The biosynthesis pathway of jasmonates is analogous to the biosynthesis of eicosanoids in animal cells. In animals, these molecules are synthesized from arachidonic acid, whereas in plants, synthesis occurs via linolenic acid, which is the main source of jasmonates.<sup>[40,41]</sup> Structurally, the biosynthesis pathway of jasmonates, being analogous to eicosanoids, is similar to that of anti-inflammatory prostaglandins in animals.<sup>[30]</sup>

The phytohormone MeJA has been characterized as a vital cellular regulator involved in a number of dynamic processes, linked to the development of active responses in the defence against biotic and abiotic stresses.<sup>[31,42]</sup> It is also active in processes closely linked to oxidative stress, regulating the activity of antioxidant enzymes.<sup>[43]</sup>

Some plants contain relatively high levels of circulating MeJA: the olive tree, species of the *Jasminum* genus, the orchid *Cymbidium goeringii*, the tuberose (*Polianthes tuberosa*), Chloranthus spicatus, Ginger, *Boronia megastigma*, honeysuckle (*Lonicera japonica*), Artemisia tridentate and rosemary (*Rosmarinus officinalis*).<sup>[44]</sup>

Stress-related hormones in plants are activators of cellular responses, including cell death in some stress situations. It is known that JA induces cell death in several lineages of cancer cells, such as lymphoblastic leukaemia, in a manner that does not affect normal human lymphocytes.<sup>[45]</sup> MeJA is selectively toxic for cancer cells,<sup>[46–48]</sup> without affecting normal cells, inducing apoptosis by several mechanisms<sup>[49]</sup> and even exhibiting major antiproliferative potential.<sup>[50]</sup>

Jasmonates have proven anti-inflammatory effects, an action that is attributed to the inhibition of the release of inflammatory mediators<sup>[40]</sup> and antioxidants.<sup>[51–54]</sup> Previous studies have shown that the use of MeJA as a model of prostaglandin induces significant anti-inflammatory effects, inhibiting the production and gene expression of mediators of proinflammatory cytokines, nitric oxide (NO) and the interleukins IL-1 $\beta$  and IL-6, as well as tumour necrosis factor (TNF) in murine macrophages,<sup>[40,55]</sup> it also exhibits neuroprotective activity.<sup>[52]</sup>

## Intestinal apoptosis

The intestinal epithelial layer is renewed every 2–3 days, establishing an important balance in the proliferation of epithelial cells in the crypts, villus cell migration in the small intestine or on the surface of the colon where enterocyte shedding will occur, regulating cell death process. The epithelium lies between the immune cells in the lamina propria and the microbiota in the gut lumen and communicates with both. In the case of occasional defects in this process, the epithelium can contribute to the beginning of the establishing of IBD, the abnormal immune responses in the intestinal mucosa could be a key event in the pathogenesis/immunopathogenesis of this disease.<sup>[56,57]</sup>

Apoptosis can be considered an important regulatory pathway of programmed cell death, as it is the most highly regulated process whereby cells undergo biochemical and morphological changes. This process is therefore called programmed cell death and downregulated by families of proteins called caspases, which when activated play an important role in regulating the process. The molecular mechanisms that establish the mode of action or activation of these proteins are still not fully understood, however.<sup>[10,58,59]</sup>

In the apoptosis process, biochemical and morphological changes control a cascade of events. First, a condensation of the chromatin occurs, followed by cell shrinkage. Subsequently, the nucleus and the DNA begin to fragment in an endonuclease catalysed reaction. In this regulatory step, the surface of the cell transforms, and the division of the cell in apoptosis is complete.<sup>[45,59]</sup>

For UC and CD, the apoptotic process occurs naturally and is considered normal in cells, which have some specific differences. The epithelial cells move from the crypts, migrating to the cell surface, and when they are installed, initiate apoptosis. Subsequently, two different pathways can be followed, either to the intestinal lumen or phagocytosed by the action of macrophages. In the inflammatory process, mature apoptotic T-cells signal to effector T cells during the clonal expansion process, avoiding chronic inflammation. A possible dysregulation of the apoptotic process in the immune system may affect the survival of T cells, mainly, altering innate immune and adaptive immune responses in the intestinal mucosa.<sup>[10,58,60]</sup>

Tumour necrosis factor, the TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and the Fas ligand (FasL) act as potential precursors in the activation of necroptosis, which can be further modulated by a protease family, known as caspases, which are active in more specific processes, such as chromatin condensation. Their functions include the reduction of cell volume and nuclear fragmentation,



stimulating the formation of bubbles in the plasma membrane, promoting changes in cell morphology and decreasing nuclear content, but without extravasation to the microenvironment.<sup>[20,59,61]</sup>

The extrinsic apoptotic pathway is known as a cell death receptor activation pathway, where a ligand–receptor type interaction occurs, stimulating the formation of a destruction complex with the integrated action of cellular proteins activated by TNF, TRAIL and FasL, promoting the catalytic activation of caspase 8, considered a central protease and the main mediator of the extrinsic pathway.<sup>[20,59]</sup>

The intrinsic pathway is activated upon activation of the p53 gene, known as the ‘guardian of the genome’. This gene regulates the Bcl-2 family after detecting DNA damage. The p53 gene triggers cell death via a cascade with both pre- and pro-apoptotic domains. These domains modulate the catalytic activity of caspase 9 and could be considered the central mediating proteases of the intrinsic pathway.<sup>[20]</sup>

The integrated or isolated activation of the extrinsic (caspase 8) and intrinsic (caspase 9) pathways can establish the activation of other caspase families (3, 6 and 7). The activation of these other families favours a process of cleavage in relation to other proteins and, concurrently, potentiates the possible advance of the state of cellular destruction, originating apoptotic bodies.<sup>[20]</sup>

In these IBDs, the location of the apoptotic cells has some peculiarities, such as in the spontaneous apoptotic process, which is independent of the activation of the p53 gene, and has as its main objective the homeostatic maintenance of stem cells. It occurs only in the region of the stem cells in the small intestine, being very rarely observed in the crypts of the colon and widely distributed along the length of the crypt. In contrast, the Bcl-2 family of proteins is not widely expressed in the small intestine, being more densely expressed at the base of the colonic crypts.<sup>[62,63]</sup> The proliferative zone of the intestinal epithelial cells is located in the lower regions of the crypts. This region corresponds to the epithelial crypts, where the apoptosis process takes place.<sup>[64]</sup>

A notable apoptotic expansion in the epithelial crypt cells is visible during UC and CD. In-vitro and in-vivo assays have described this occurrence, suggesting that TNF represents an important modulator of the pathways in which it acts, inducing programmed cell death in the epithelial crypt cells. However, other studies have shown that the p53 gene is an important mediator of growth, apoptosis and cellular senescence as well as an apoptotic mediator in the colonic crypt during colitis, suggesting that signals originating from the TNF, either through tumour necrosis factor receptor 1 (TNFR1) or tumour necrosis factor receptor 2 (TNFR-2), are responsible for the stimulation of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme mediated by the

p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells in the crypts.<sup>[64,65]</sup>

## **MeJA: a potential phytohormone for anti-TNF therapy in the treatment of IBDs**

Inflammatory bowel diseases are characterized by an excessive number of apoptosis in the epithelial crypt, ulcerations, distorted crypt architecture and diarrhoea accompanied by bleeding. Another significant feature of IBDs is the large-scale expression of TNF in the mucosa. Therapy using anti-TNF antibodies contributes to patient improvement, as they reduce diarrhoea, intestinal bleeding, weight loss and act to promote healing of the mucosa, inducing a rapid re-epithelialization of the ulcerated surfaces. Previous studies have shown that other anti-TNF agents can induce apoptosis in cells of the lamina itself.<sup>[64]</sup>

Recent studies have demonstrated that there is a strong interaction between autophagy/apoptosis, the detection of microbes and an increase in the expression of the endoplasmic reticulum in the intestinal epithelium, contributing to the pathogenesis of IBDs. In this sense, necroptosis therefore would be associated with the activation of the TNF receptors. All these mechanisms could be present in Crohn’s disease and in other animal models that mimic intestinal inflammation.<sup>[64]</sup> The mechanism of action reveals that anti-TNF therapy involves the homeostatic regulation of apoptosis in mucosal cells.<sup>[66]</sup>

In Hep3B-type cancer cell lineages treated with a synthetic derivative of MeJA, apoptosis was mediated via the signalling cascade, cell death receptors and the extrinsic pathway as well as by the action of the mitochondria associated with the activation of protein kinases. This treatment induced the expression of the Bax/Bcl-2 proteins related to the cell death receptor, as well as the downregulation of the IAP (the inhibitor of apoptosis proteins) and caspase 8 families, and also the negative regulation of the caspase 3 and 9 families.<sup>[67]</sup>

In the human breast MCF-7 and MDA-MB-435 cells, MeJA inhibited long-term proliferation and demonstrated G0/G1 and S-phase arrest with an increasing apoptotic population. The extrinsic apoptotic pathway increased the expression of TNFR1 and the activation of caspase 8 and activated caspase 3 in breast cancer cells, and also resulted in the further activation of the intrinsic apoptotic pathways.<sup>[68]</sup>

In hormone-independent human prostate PC-3 and DU 145 cancer cells, MeJA treatment resulted in the activation of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) and caspase, inhibited cell growth, induced cell cycle arrest and apoptosis.<sup>[69]</sup> In radiation-induced human prostate cancer lines (PC-3), MeJA suppressed the expression of the Bcl-2

anti-apoptotic protein family and increased caspase 3 activity.<sup>[70]</sup>

In this sense, MeJA and its analogues have the potential to inhibit TNF production in murine macrophage<sup>[40]</sup> and HCAT keratinocyte cells.<sup>[71]</sup> To date, in clinical practice, only antibody therapy has been found to be an efficient method of neutralizing the effects of TNF in patients with chronic inflammatory conditions such as IBDs.<sup>[72]</sup>

The first hypothesis is based on the possible therapeutic potential of MeJA in the modulation of IBDs, suggesting an anti-regulatory mechanism, based on the reduction of the expression of TNF tissue levels, minimizing apoptosis in the intestinal crypts with a direct effect on the apoptotic extrinsic pathway. TNF acts as a major pro-inflammatory cytokine in pathway signalling.

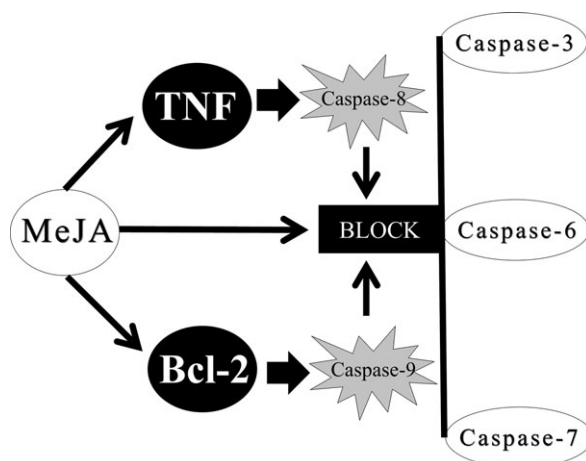
Thus, it is believed that MeJA can act integrally in the intrinsic pathway, as in cancerous cell lineages it altered the expression profile of the Bcl-2 proteins. Thus, MeJA could be a new candidate for pharmacological targeting in the treatment of IBDs, modulating the expression of caspase 9 (extrinsic pathway) by promoting a decrease in TNF expression and interfering with caspase 8 expression directly by maintaining the expression of the Bcl-2 proteins. Thus, a potential effect of MeJA as a blocker of the extrinsic pathway, as well as in the intestinal apoptotic intrinsic pathway, could direct the negative regulation of the gene expression of superfamilies of type 3, 6 and 7 caspases, thus, altering the tissue expression of type 8 and 9 caspase families (Figure 2).

## MeJA: the possible modulating action of ROS production and maintenance of intestinal apoptosis

The mechanisms related to the apoptotic process promoted by the action of MeJA are still unknown, but it is understood that MeJA disrupts the cell cycle, even though the apoptosis is restricted and selective to cancer cells. However, the underlying mechanism of MeJA-induced apoptosis remains unclear. Its effects on the induction of p53-dependent and p53-independent apoptosis, which further modulates the production of ROS (reactive oxygen species) and results in low toxicity effects, are already established.<sup>[73]</sup>

In the treatment of cancer cell lineages causing an Ehrlich tumour (breast cancer), a type of synthetic derivative of MeJA demonstrated low anti-angiogenic and inhibitory activity for the growth of tumour cells.<sup>[74]</sup> In gastric cancer cells (SGC-7901 and MKN-45 cells lines), MeJA was able to decrease the expression of MMP-14 (matrix-14 metalloproteinases) that act in the degradation of the extracellular matrix (ECM), like a pericellular collagenase, allowing the remodeling of the ECM, aiding tumour invasion and promoting the onset of lymph node metastases. MeJA allowed cell migration and invasion inhibition and also inhibited angiogenesis.<sup>[48]</sup>

Specific enzymes produced by cancer cells and activated by certain signals, such as matrix metalloproteinases (MMPs), have been described as degrading ECM and are associated with the progression of gastric cancer.<sup>[75,76]</sup> The



**Figure 2** The hypothetical mechanism of methyl jasmonate as a therapeutic and pharmacological target in the treatment of inflammatory bowel diseases, blocking two apoptotic pathways. In the extrinsic pathway of the apoptotic process, methyl jasmonate altered the expression of tumour necrosis factor levels, blocking the expression of the caspase 8 family. In the intrinsic pathway of apoptosis, methyl jasmonate regulated Bcl-2 proteins, inhibiting the expression of the caspase 9 family. Blocking the extrinsic and intrinsic pathways would also block caspase 3, 6 and 7 families, which are dependent on the molecular signalling mediated by both pathways, thus altering the apoptotic profile of the intestinal epithelial cells, especially during migration and proliferation in the crypts.

MMP-14 is involved in the invasion of tumours and metastases, allowing cancer cells to remodel and penetrate the ECM,<sup>[48]</sup> evidencing the strong connection between MMP-14 expression and the progression of cancer.<sup>[48,77]</sup>

Methyl jasmonate is known to have great potential for reducing apoptosis. In human lung adenocarcinoma cells (lineage A549), it was involved in the production of ROS and induced an increase in the expression of pro-apoptotic members of the Bcl-2 family. Through the catalase enzyme, it was found that MeJA, despite increasing expression, did not induce changes in the members of the Bcl-2 family. In this sense, the induction of apoptosis in the A549 cell line promoted by the action of MeJA appears to be mediated by a cascade, which involves the generation of hydrogen peroxide, in addition to an increase in the expression of pro-apoptotic members of the Bcl-2 protein family and the induction of mitochondrial-mediated apoptosis via activation of the caspase 9 and 3 superfamilies.<sup>[48,78]</sup>

In prostate cancer cell lines (U145 and PC-3) and proximal tubular epithelial cells (HK-2), a cellular inhibitory effect was observed only on the growth of the cancerous lineages, while the development of the proximal tubular cells was not inhibited. The action of MeJA altered the mitochondrial morphology, leading to the release of cytochrome c, as well as transforming and activating the families of caspase 9 and caspase 3.<sup>[79]</sup>

Anticancer activity against human lung A549 cells and HL-60 leukaemia cells was evaluated using fruit extracts of blackberries treated with MeJA. The results showed enhanced inhibition of A549 cell and HL-60 cell proliferation and induced the apoptosis of HL-60 cells.<sup>[51]</sup>

In C6 glioma cell lineages, MeJA induced the expression of the heat shock protein (HSP72) via thermal shock factor I. It also induced the production of hydrogen peroxide, superoxide ions and mitochondrial ROS, showing that the different MeJA activity in cancer cell lineages can be mediated via ROS.<sup>[80]</sup> In assays using hepatocellular carcinoma cells (HepG2 lineage), apoptosis was induced by combining a MeJA analogue with TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand receptors). The effect of this combination triggered the down-regulation of Bcl-X as well as the activation of a ROS-mediated caspase signalling cascade.<sup>[81]</sup>

In human myeloid leukaemia cells, the MeJA-induced gene expression profile resembles IPA (isopentenyladenine) and is very effective at inducing cell differentiation when using HL-60 myelomonocytic lineages. The gene expression profile associated with the exposure of cell lines to MeJA was verified using cDNA microarray, which revealed similarities to IPA, suggesting that both inducers share many common transduction systems for inducing the differentiation of leukaemia cells, stimulating both the morphological and functional differentiation of freshly isolated leukaemia cells from patients with haematological malignancies.<sup>[82]</sup>

In different uterine cancer strains (HeLa and CaSki), MeJA induced apoptosis by elevating the mitochondrial superoxide anion levels. Although changes in p53 and Bax expression varied, MeJA promoted the negative regulation of survivin in uterine cancer cell lineages, a protein involved in the inhibition of apoptosis.<sup>[50]</sup>

Methyl jasmonate exhibits target specificity when binding to hexokinase, the initial glycolytic pathway enzyme, disrupting its association with the anionic voltage-dependent channel (CAVD), causing an energy deficiency and promoting the release of cytochrome c from the mitochondria, triggering apoptosis in cancer cells.<sup>[44]</sup> In cells of patients with chronic myeloid leukaemia (CML), MeJA induced the release of cytochrome c and mitochondria, cell swelling and cell membrane depolarization only in Hep3B hepatoma cells, without altering mitochondria isolated from untransformed 3T3 cells.<sup>[83]</sup>

In the second hypothesis, it is believed that MeJA represents a new alternative for the treatment of IBDs, as it acts only on the destruction of cells that express the diseased phenotype and preserves cells that are not transformed. This signalling may occur via the transduction of signals, inducing morphological and functional differentiations in the cells, altering ECM composition and transforming angiogenesis.

It is also believed that MeJA may assist in the process of cell renewal of the intestinal mucosa, assisting in the cell cycle process of the transformed cells via apoptotic pathways triggered by the induction of mitochondrial ROS, negatively regulating the expression of protein families that are important for the modulation of the apoptotic process. It acts principally in the regulation of the Bcl-2 protein family, which are important in the activation of the caspase 3 and 9 families (Table 1).

## Conclusion

The restoration and cell renewal of the intestinal mucosa maintains the integrity and homeostasis of the epithelial barrier and could be considered a therapeutic target for improving the health of the intestinal tissue using synthetic substances.

As well as synthetic drugs, phytohormones or other natural products such as MeJA and its derivatives have displayed potential for the reduction of inflammation and oxidative damage impact in the pathogenesis of intestinal diseases, including most of those with IBD profiles.

Due to its anti-apoptotic potential, the lipid phytohormone MeJA represents a new therapeutic target for the treatment of inflammatory bowel diseases. It acts effectively on the regulation of the gene expression of the extrinsic and intrinsic pathways of the superfamily of caspase-type proteases, eliminating only cells expressing a diseased phenotype, and preserving untransformed and healthy cells.



**Table 1** In-vitro or ex-vivo studies on the antitumoral activity of methyl jasmonate or synthetic derivative

MeJA or synthetic derivative (dose/concentration)	Activity measured	Assay ( <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> )	Experimental results	Conclusion	Reference
0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM of MeJA	Antitumor activity	EL-4 (mouse T lymphoma cell line). <i>in vivo</i> ; LNCaP cell (androgen-responsive human prostate adenocarcinoma), MCF7 cell line (Human breast carcinoma), Molt-4 is a human T lymphoblastic leukaemia cell line, SK-28 (human melanoma cells) <i>in vitro</i>	MeJA induced apoptotic death and elevation of caspase 3 activity. Mice bearing EL-4 lymphoma, survived for longer periods of time after the treatment than untreated mice	MeJA induced death in each of the cell lines.	[45]
0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 mM of MeJA	Antitumor activity	Two clones of murine B-lymphoma cells (wild-type (wt) p53 and Mutated type p53) <i>in vitro</i>	Each MeJA was equally cytotoxic and induced a rapid depletion of ATP by compromising oxidative phosphorylation in the mitochondria in both clones, mostly leading to apoptotic death in the wt p53-expressing cells	MeJA can circumvent the resistance of mutant p53-expressing cells towards chemotherapy by inducing non-apoptotic cell death	[46]
0.5; 0.75, 1.5 and 3.0 mM of MeJA	Antitumor activity	Human bladder cancer cell lines T24 and BIU-87 <i>in vitro</i>	In a xenograft mouse model of human bladder carcinoma, the combination of GA and MJ exerted increased antitumour activity compared with gammaic acid (GA) alone	MeJA enhanced GA-induced activation of caspase 3 and caspase 9, and downregulated the expression of XIAP	[47]
0.05; 0.01 and 0.2 mM of MeJA	Antitumor activity	Human gastric cancer/SGC-7901 and MKN-45 cells lines) <i>in vitro</i>	MeJA attenuates the migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer cells in a time- and dose-dependent manner, with downregulation of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14)	MeJA was able to decrease the expression of MMP-14, allowing the remodeling of the ECM, aiding tumour invasion and promoting the onset of lymph node metastases, and also inhibited angiogenesis	[48]
1 and 2 mM of MeJA	Antitumor activity	CaSki, SiHa, HeLa, C33A cervical carcinoma cell lines <i>in vitro</i>	MeJA induced apoptosis by elevating the mitochondrial superoxide anion levels in different uterine cancer strains (Hela and CaSki)	MeJA promoted the negative regulation of survivin protein involved in the inhibition of apoptosis in uterine cancer cell lineages	[50]
Fruit extracts of blackberries treated with MeJA (0.01 and 0.1 mM)	Antitumor activity	Human lung A549 cells and HL-60 leukaemia cells <i>in vitro</i>	The MeJA treatment significantly enhanced the content of flavonoids, antioxidant capacities and the inhibition of cancerous lines	The results showed enhanced inhibition of A549 cell and HL-60 cell proliferation and induced the apoptosis of HL-60 cells	[51]
50 µM of J-7 ([methyl 5-chloro-4,5-dihydrojasmonate] (7))	Antitumor activity	Human hepatoma Hep3B cells <i>in vitro</i>	J-7 induced the expression of the Bax/Bcl-2 proteins related to the cell death receptor, as well as down-regulation of the IAP (inhibitor of apoptosis proteins) and caspase 8 families, and also the negative regulation of the caspase 3 and 9 families	The apoptosis was mediated via the signalling cascade, cell death receptors, the extrinsic pathway and also by the action of the mitochondria associated with the activation of protein kinases	[67]

**Table 1** (Continued)

MeJA or synthetic derivative (dose/concentration)	Activity measured	Assay ( <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> )	Experimental results	Conclusion	Reference
0.5 and 3 mM of MeJA	Antitumor activity	Human breast MCF-7 and MDA-MB-435 cells <i>in vitro</i>	MeJA inhibited long-term proliferation, exhibited G0/G1 and S-phase arrest with increased apoptotic population. In the extrinsic apoptotic pathway it increased expression of TNFR1 and activation of caspase 8 and activated caspase 3 in breast cancer cells	Activation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways	[68]
2 mM of MeJA	Antitumor activity	Hormone-independent human prostate PC-3 and DU 145 cancer cells <i>in vitro</i>	MeJA treatment resulted in Tumour Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) activation and caspase 3 activation	MeJA promoted inhibited cell growth, induced cell cycle arrest and apoptosis	[69]
0.5; 1.0 and 2.0 mM of MeJA	Antitumor activity	Human prostate adenocarcinoma cell line (PC-3) <i>in vitro</i>	MeJA suppressed the expression of the Bcl-2 anti-apoptotic protein family and increased caspase 3 activity	Modulation of Bcl-2 and caspase 3	[70]
0.4; 0.8 and 1.6 mM of MeJA	Antitumor activity	Human NSCLC (non-small cell lung cancer): A549/CTRL, A549/CFLAR, H157/CTRL, H157/CFLAR and U87-MG-EGFP-MAP1LC3B ( <i>in vitro</i> )	MeJA induced apoptosis via the DDIT3-TNFRSF10B-CASP pathway and induced pro-apoptotic autophagy in NSCLC cells. MeJA induced pro-apoptotic autophagy in NSCLC cells by triggering the ROS pathway	MJ inhibited cell proliferation and induced apoptosis via TNFRSF10B upregulation human NSCLC	[73]
MeJA	Antitumor activity	Human lung adenocarcinoma cells/lineage A549 <i>in vitro</i>	MeJA promoted the induction of apoptosis in the A549 cell line involving the generation of hydrogen peroxide, in addition to increasing the expression of pro-apoptotic members of the Bcl-2 protein family and the induction of mitochondrial-mediated apoptosis via activation of the caspase 9 and 3 superfamilies	In lineage A549, MeJA was involved in the production of ROS and induced an increase in the expression of pro-apoptotic members of the Bcl-2 family	[78]
2, 5; 5 and 10 mg/kg of MJ (methyl dihydrojasmonate)	Antitumor activity	Ehrlich tumour cells ( <i>in vivo</i> by weekly subcultures in mice)	Antiangiogenic effects	In-vivo antitumor activity, MJ revealed that the effect of the MeJA was comparable to DOX (doxorubicin) positive control effect by inhibiting tumour growth and killing tumour cells	[74]
1 mol/l of MeJA	Antitumor activity	Human prostate carcinoma cells DU145, PC-3 and human proximal tubular epithelial cells HK-2 <i>in vivo</i>	MeJA treatment promoted a cellular inhibitory effect which was observed only on the growth of the cancerous lineages, while the development of the proximal tubular cells was not inhibited	The treatment altered the mitochondrial morphology, leading to the release of cytochrome c, as well as transforming and activating the families of caspase 9 and caspase 3	[79]

**Table 1** (Continued)

MeJA or synthetic derivative (dose/concentration)	Activity measured	Assay ( <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> )	Experimental results	Conclusion	Reference
MeJA	Antitumor activity	Human C6 glioma cells <i>in vitro</i>	MeJA induced the production of hydrogen peroxide, superoxide ions and mitochondrial ROS and also, the expression of the heat shock protein (HSP72) via thermal shock factor I	The results showed that the different MeJA activity in cancer cell lineages can be mediated via ROS	[80]
0, 10, 25 and 50 $\mu\text{M}$ of J7 (methyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate (7))	Antitumor activity	Human hepatocarcinoma cells (HepG2) <i>in vitro</i>	Apoptosis was induced by combining a MeJA analogue with TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand receptors). The effect of this combination triggered the down-regulation of Bcl-X as well as the activation of a ROS-mediated caspase signalling cascade	The effect of this combination triggered the down-regulation of Bcl-X as well as the activation of a ROS-mediated caspase signalling cascade	[81]
0.15 and 0.4 mM of MeJA	Antitumor activity	Human myeloid leukaemia (HL-60 cell line) <i>in vitro</i>	MeJA induced gene expression profile resembled IPA (isopentenyladenine) and was very effective at inducing cell differentiation when using HL-60 myelomonocytic lineages	The gene expression revealed similarities between MeJA and IPA, suggesting that both inducers share many common transduction systems for inducing the differentiation of leukaemia cells, stimulating both the morphological and functional differentiation of leukaemia cells	[82]
10, 20, 30 and 40 $\mu\text{M}$ of two enantiomers of DDHJ (Methyl 4,5-didehydrojasmonate)	Antitumor activity	Human myeloid leukaemia (HL-60 cell line) <i>in vitro</i>	DDHJ was around 30 times more potent than MJ and the natural form of the stereoisomer was more efficient than the unnatural isomer	Jasmonate derivatives may be promising therapeutic agents for differentiation therapy of leukaemia	[82]
1, 2 mmol/l of MeJA	Antitumor activity	Human Hep 3B hepatoma cells and 3T3 is a human fibroblast immortal	MeJA induced the release of cytochrome c and mitochondria, cell swelling and cell membrane depolarization only in Hep3B hepatoma cells, without altering mitochondria isolated from untransformed 3T3 cells	Jasmonates act directly on mitochondria derived from cancer cells	[83]

It can also modulate signal transduction processes during the cell renewal of the intestinal mucosa and assist in the cell cycle process of transformed cells in UC and DC.

## Declarations

### Conflicts of interest

The Authors declare that they have no competing interests related to this work.

## Ethical approval

The study had no ethical approval requirements.

## Acknowledgements

The authors are thankful to the Brazilian agencies CNPq, CAPES and Fundação Araucária for their financial support to this work.

## References

- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 3–9.
- Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504–1517.
- Ordas I *et al.* Ulcerative colitis. *Lancet* 2012; 380: 1606–1619.
- Hindryckx P, Laukens D. Intestinal barrier dysfunction: the primary driver of IBD? In: Karoui S, ed. *Inflammatory Bowel Disease: Advances in Pathogenesis and Management*. In-Tech; 2012: 23–40.
- Odenwal MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 9–21.
- Pedersen J *et al.* Inhibitors of apoptosis (IAPs) regulate intestinal immunity and inflammatory bowel disease (IBD) inflammation. *Trends Mol Med* 2014; 20: 652–665.
- Gerbe F *et al.* The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2907–2917.
- Mills S, Stamos MJ. Colonic Crohn's disease. *Clin Colon Rectal Surg* 2007; 20: 209–313.
- Miron N, Cristea V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol* 2012; 167: 405–412.
- Günther C *et al.* Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* 2013; 62: 1062–1071.
- Xu XR *et al.* Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3255–3264.
- Van Wijk F, Cheroutre H. Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6: 559–566.
- Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474: 298–306.
- Cominelli F. Cytokine-based therapies for Crohn's disease—new paradigms. *N Engl J Med* 2004; 351: 2045–2048.
- Corridoni D *et al.* Inflammatory bowel disease. *Immunol Lett* 2014; 161: 231–235.
- Spehlmann ME *et al.* Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 968–976.
- Torres J, Colombel JF. Genetics and phenotypes in inflammatory bowel disease. *Lancet* 2016; 387: 98–100.
- Silverberg MS *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19: 5–36.
- Sarlos P *et al.* Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: review of the current literature. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014; 5: 304–321.
- Nunes T *et al.* Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1–12.
- Kaiko GE *et al.* Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008; 123: 326–338.
- Valatas V *et al.* Experimental colitis models: insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. *Euro J Pharmacol* 2015; 759: 253–264.
- Guglani L, Khader SA. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5: 120.
- Monk JM *et al.* Antagonizing arachidonic acid-derived eicosanoids reduces inflammatory Th17 and Th1 cell-mediated inflammation and colitis severity. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 917149.
- Moreno JJ. Eicosanoid receptors: targets for the treatment of disrupted intestinal epithelial homeostasis. *Eur J Pharmacol* 2017; 796: 7–19.
- Mccartney SA *et al.* Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1115–1118.
- Jurjus A *et al.* Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: the links. *BBA Clin* 2016; 5: 16–24.
- Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med* 2012; 237: 474–480.
- Balmus IM *et al.* The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease:

- clinical aspects and animal models. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22: 3–17.
30. Cheong JJ, Do CY. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet* 2013; 19: 409–413.
  31. Shivshankar MG, Shanmugarajan TS. Methyl jasmonate: new insights into a potent phytohormone. *Int J Pharm Biol Sci* 2016; 7: 244–249.
  32. Hernández-Oñate MA, Herrera-Estrella A. Damage response involves mechanisms conserved across plants, animals and fungi. *Curr Genet* 2015; 61: 359–372.
  33. Pirbalouti AG *et al.* A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)* 2014; 347: 229–239.
  34. Demole E *et al.* Solement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv Chim Acta* 1962; 45: 675–685.
  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. *C R Acad* 1967; 264: 2074–2076.
  36. Aldridge DC *et al.* Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J Chem Soc C* 1971; 0: 1623–1627.
  37. Ueda J, Kato J. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol* 1980; 66: 246–249.
  38. Dathe W *et al.* Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* 1981; 153: 530–535.
  39. Vick BA, Zimmerman DC. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol* 1984; 75: 458–461.
  40. Dang HT *et al.* New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 10228–10235.
  41. Schaller F *et al.* Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* 2005; 23: 179–199.
  42. Fugate KK *et al.* Jasmonic acid causes short- and long-term alterations to the transcriptome and the expression of defense genes in sugarbeet roots. *Plant Gene* 2017; 9: 50–63.
  43. Parra-Lobato MC *et al.* Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. *Environ Exp Bot* 2009; 66: 9–17.
  44. Cohen S, Flescher E. Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* 2009; 70: 1600–1609.
  45. Fingrut O, Flescher E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia* 2002; 16: 608–616.
  46. Fingrut O *et al.* Jasmonates induce nonapoptotic death in high-resistance mutant p53-expressing B-lymphoma cells. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 800–808.
  47. Wang Y *et al.* Methyl jasmonate sensitizes human bladder cancer cells to gambogic acid-induced apoptosis through down-regulation of EZH2 expression by miR-101. *Br J Pharmacol* 2014; 2014: 618–635.
  48. Zheng L *et al.* Methyl jasmonate abolishes the migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase 14. *BMC Cancer* 2013; 13: 1–13.
  49. Farooqi AA *et al.* Algae extracts and methyl jasmonate anti-cancer activities in prostate cancer: choreographers of 'the dance macabre'. *Cancer Cell Int* 2012; 12: 1–6.
  50. Milrot E *et al.* Methyl jasmonate reduces the survival of cervical cancer cells and downregulates HPV E6 and E7, and surviving. *Cancer Lett* 2012; 319: 31–38.
  51. Wang SY *et al.* Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chem* 2008; 107: 1261–1269.
  52. Eduviere AT *et al.* Methyl jasmonate enhances memory performance through inhibition of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in mice. *Life Sci* 2015; 132: 20–26.
  53. Umukoro S *et al.* Evaluation of adaptogenic-like property of methyl jasmonate in mice exposed to unpredictable chronic mild stress. *Brain Res Bull* 2016; 121: 105–114.
  54. Shivshankar G, Shanmugarajan TS. *In vitro* potential of plant stress hormone Methyl Jasmonate for anti-arthritis, anti-inflammatory and free radical scavenging activity. *Int J Pharm Tech Res* 2015; 8: 161–165.
  55. Dang HT *et al.* *In vitro* stability and in vivo anti-inflammatory efficacy of synthetic jasmonates. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 4109–4116.
  56. Wallace KL *et al.* Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6–21.
  57. Kmiec Z *et al.* Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci* 2017; 62: 1–16.
  58. Negroni A *et al.* Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 1–10.
  59. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
  60. Zhang N *et al.* The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* 2005; 15: 749–769.
  61. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 263–268.
  62. Renehan AG *et al.* The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 166–176.
  63. Merritt AJ *et al.* Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia: correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108: 2261–2271.
  64. Goretsky T *et al.* p53 mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD. *Am J Pathol* 2012; 181: 1306–1315.
  65. Bhattacharya S *et al.* Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 2009; 21: 509–522.
  66. Marini M *et al.* TNF- $\alpha$  neutralization ameliorates the severity of murine

- Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8366–8371.
67. Park C *et al.* A methyl jasmonate derivative, J-7, induces apoptosis in human hepatocarcinoma Hep3B cells in vitro. *Toxicol Vitro* 2010; 24: 1920–1926.
  68. Yeruva L *et al.* Methyl jasmonate decreases membrane fluidity and induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor 1 in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 2008; 19: 766–776.
  69. Yeruva L *et al.* Delayed cytotoxic effects of methyl jasmonate and cis-jasmone induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Invest* 2008; 26: 890–899.
  70. Ezekwudo D *et al.* Inhibition of expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and induction of cell death in radioresistant human prostate adenocarcinoma cell line (PC-3) by methyl jasmonate. *Cancer Lett* 2008; 270: 277–285.
  71. Kang GJ *et al.* Methyl 5-chloro-4, 5-didehydrojasmonate (J7) inhibits macrophage-derived chemokine production via down-regulation of the signal transducers and activators of transcription 1 pathway in HaCaT human keratinocytes. *Chem Pharm Bull* 2013; 61: 1002–1008.
  72. St-Pierre J, Chadee K. How the discovery of TNF-[alpha] has advanced gastrointestinal diseases and treatment regimes. *Dig Dis Sci* 2014; 59: 712–715.
  73. Zhang M *et al.* Methyl jasmonate induces apoptosis and pro-apoptotic autophagy via the ROS pathway in human non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res* 2016; 6: 187–199.
  74. da Silva GBRF *et al.* Oil-in-water biocompatible microemulsion as a carrier for the antitumor drug compound methyl dihydrojasmonate. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 585–594.
  75. Zhang M *et al.* Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2011; 103: 243–247.
  76. Kaneko T *et al.* Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 43–49.
  77. Jiang WG *et al.* Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. *Int J Mol Med* 2006; 17: 583–590.
  78. Kim JH *et al.* Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep* 2004; 12: 1233–1238.
  79. Jiang G *et al.* An N-terminal Smac peptide sensitizes human prostate carcinoma cells to methyl jasmonate-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2011; 302: 137–146.
  80. Oh SY *et al.* Induction of heat shock protein 72 in C6 glioma cells by methyl jasmonate through ROS-dependent heat shock factor 1 activation. *Int J Mol Med* 2005; 16: 833–839.
  81. Park C *et al.* J7, a methyl jasmonate derivative, enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of reactive oxygen species generation in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 86–93.
  82. Tsumura H *et al.* Gene expression profiles in differentiating leukemia cells induced by methyl jasmonate are similar to those of cytokinins and methyl jasmonate analogs induce the differentiation of human leukemia cells in primary culture. *Leukemia* 2009; 23: 753–760.
  83. Rotem R *et al.* Jasmonates: novel anti-cancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. *Cancer Res* 2005; 65: 1984–1993.

## **Artigo 2**

Será submetido ao periódico *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (*Metil jasmonato: Um fito-hormônio com atividade anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetor com potencial terapêutico para a colite experimental*), fator de impacto: 4,593 (JCR-2016) e Qualis CAPES (Ciências Biológicas I): A2.



# **Metil jasmonato: Um fito-hormônio com atividade anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora com potencial terapêutico para a colite experimental**

Jean Carlos Fernando Besson<sup>1</sup>, Graciette Matioli<sup>2</sup>, Maria Raquel Marçal Natali<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR Brasil.

\*Autor para correspondência: Maria R. M. Natali; [mrmnatali@gmail.com](mailto:mrmnatali@gmail.com)

## **Resumo**

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) correspondem a alterações morfofisiológicas no trato gastrointestinal, provocando lesões teciduais e aumento na produção de radicais livres e mediadores inflamatórios. As plantas produzem inúmeras moléculas bioativas como metil jasmonato (MeJA) que possui efeitos antioxidante, anti-inflamatório, anti-apoptótico e neuroprotetor. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual, o potencial anti-inflamatório e antioxidante do tratamento com jasmonatos, especificamente com MeJA isolado ou complexado com HP- $\beta$ -CD no colo distal de ratos com colite quimicamente induzida por TNBS. Foram utilizados ratos Wistar distribuídos em cinco grupos, discriminados de acordo com as soluções administradas e formas de tratamento durante 28 dias. Para o estabelecimento da colite experimental os animais receberam solução contendo TNBS/etanol via enema e tratamento diário via gavagem de MeJA isolado (300 mg/kg) ou MeJA (300 mg/kg) complexado molecularmente ciclodextrinas (CDs). Após 28 dias foi realizada avaliação anti-fibrótica, anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora. Constatamos que os níveis expressos de MPO e IL-17 foram regulados negativamente e o nível de IL-2 foi regulado positivamente pelo MeJA isolado que também impediu o desenvolvimento da fibrose colônica e manteve a densidade da subpopulação neuronal nitrérgica, contribuindo para a neuroproteção do SNE. O MeJA isolado também foi capaz de reduzir a lipoperoxidação lipídica (LP), diminuiu a atividade da xantina-oxidase (XO), e do conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) além de incrementar o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH). O MeJA complexado apenas se mostrou mais eficiente que o MeJA isolado ao modular a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx). Com bases nestes resultados, concluímos que o MeJA isolado apresenta potencial anti-fibrótico, anti-inflamatório, antioxidante e neuroprotetor e assim, pode ser considerado um novo alvo terapêutico para o tratamento das DIIs.

Palavra-chave: colite experimental; MeJA; antioxidante, anti-inflamatório; neuroprotetor.



## 1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) podem afetar todo o trato gastrointestinal e são caracterizadas por um exacerbado processo inflamatório comprometendo a integridade do epitélio intestinal facilitando o acesso de antígenos luminiais na lâmina própria [1,2] causando diarreia e sangramento retal [3]. Também associado às DIIs, observa-se alto risco para o desenvolvimento do câncer colorretal [4], resistência a insulina e obesidade [5].

Os danos teciduais envolvem alterações na morfologia do colo distal as quais estimulam a formação de abscessos e estão intrinsecamente ligadas à ativação de diferentes tipos de células imunes como os neutrófilos, macrófagos e células T [4,6]. Esta expansão da inflamação colônica contribui consideravelmente para a formação de ulcerações, pólipos inflamatórios, fibrose, alterações neuronais e necrose completa da túnica mucosa [6]. A patogênese das DIIs compreende ainda um aumento local de citocinas pró-inflamatórias, síntese de eicosanoides, metabólitos do nitrogênio e outros mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a desregulação da resposta imunológica [1,2] contribuindo para um potencial desenvolvimento de fibrose colônica [7].

Os danos ao sistema nervoso entérico (SNE) estão intimamente associados à inflamação e disfunção intestinal representando importante via para o tratamento das DIIs. O SNE é constituído por células gliais e neurônios que formam dois plexos ganglionares evidentes, o plexo submucoso e o plexo mioentérico. Compondo os gânglios mioentéricos, estão presentes os interneurônios nitrérgicos que expressam a enzima óxido nítrico óxido sintase (nNOS), produtora do neurotransmissor óxido nítrico (NO) responsável pelo controle neural da secreção e motilidade intestinal e do tônus vascular [8,9].

A produção de NO altera a resposta inflamatória inibindo a adesão de moléculas aos neutrófilos, regula negativamente a atividade de mastócitos e

altera a ação de citocinas derivadas de macrófagos no trato gastrointestinal, promovendo a apoptose de macrófagos e dos linfócitos TCD4 e TCD8 do sistema imune [8]. A combinação de NO com radicais livres ROS (espécies reativas de oxigênio) aumenta consideravelmente a permeabilidade da membrana plasmática e aumenta a concentração de cálcio estimulando a inflamação intestinal devido ao danos axonais e morte neuronal levando a dismotilidade intestinal e o desenvolvimento de câncer de colo [8,9].

O estresse oxidativo favorece o desenvolvimento das DIIs através da produção de radicais livres que estimulam a peroxidação lipídica que lesionam a barreira mucosa e ativam a produção de mediadores inflamatórios devido ao aumento da expressão de mediadores da inflamação como o ROS [2,10]. O aumento de ROS ativa o fator nuclear NF-kappa B (NF- $\kappa$ B) [11], estimulando a transcrição de genes pró-inflamatórios [12] promovendo alterações na mucosa colônica levando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , 6, 12 e o TNF- $\alpha$ , ativação de neutrófilos e das enzimas ciclooxigenase (COX)-2 e iNOS (óxido nítrico-sintase induzível) aumentando ainda mais o estresse oxidativo [3, 11].

Um dos modelos mais comuns que mimetizam a inflamação intestinal utiliza o 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), o qual ativa a resposta imune mediada por células T *helper* do tipo 1 [9]. A administração de TNBS degrada as proteínas da mucosa colônica desencadeando intensa resposta inflamatória semelhante a DII humana, especialmente a doença de Crohn (DC) [13]. Desenvolvido por Morris e colaboradores [14], este modelo está baseado na hipótese de que um aumento na permeabilidade da mucosa resulta na entrada de um antígeno luminal na lâmina própria, que não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico da mucosa. Desta forma o uso de uma solução contendo etanol (usado para romper a barreira epitelial) se associa ao ácido TNBS de alto peso molecular, destruindo as proteínas teciduais e desencadeando a resposta imunológica no colo distal [15].

Algumas limitações com relação à eficiência dos fármacos no tratamento das DIIs são comumente associadas aos fatores que mantêm a patogênese da doença e as diferentes respostas dos pacientes frente ao tratamento utilizando drogas de referência. Portanto, estudos adicionais no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das DIIs são de grande importância [12].

O metil jasmonato (MeJA) é um fito-hormônio pertencente a família dos jasmonatos (JA) derivado do ácido jasmônico (AJ), pode ser encontrado em diversas plantas como alecrim, angélica, gengibre, jasmim, madressilva e oliveira [16]. Os JA são ácidos graxos oxigenados derivados do ácido linolênico [17] envolvidos na sinalização intracelular dos mecanismos de defesa em resposta a agressões teciduais ou danos ambientais [18]. Em células animais, a família dos JA demonstra comprovados efeitos antioxidantes [19] e anti-inflamatórios, uma ação atribuída principalmente à inibição da liberação de mediadores inflamatórios [20].

Estruturalmente, a via de biossíntese do JA é análoga aos eicosanoides e semelhantes à das prostaglandinas anti-inflamatórias em animais. Como um modelo de prostaglandina, o MeJA está envolvido em processos relacionados ao estresse oxidativo, especificamente regulando a atividade das enzimas antioxidantes [21]. Dentre os seus comprovados efeitos anti-inflamatórios, o MeJA é capaz de suprimir a atividade de COX-2, NO, NF- $\kappa$ B, IL 1 $\beta$ , IL-6 e TNF em macrófagos de murinos [22], também exibe atividade neuroprotetora [23, 24] e anti-neuroinflamatória [25].

De maneira geral os jasmonatos são pouco solúveis em água, enquanto a solubilidade do MeJA é consideravelmente mais baixa [26]. A solubilidade de um fármaco pode ser melhorada utilizando um excipiente como as ciclodextrinas (CDs) [27]. As CDs são oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexos de inclusão molecular com fármacos pouco solúveis aumentando assim sua estabilidade e solubilidade em água, apresentam menos

efeitos adversos devido à sua meia-vida plasmática ser curta garantindo uma ótima absorção sistêmica [27, 28].

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual, o potencial anti-inflamatório e antioxidante do tratamento com jasmonatos, especificamente com MeJA isolado ou complexado com HP- $\beta$ -CD no colo distal de ratos com colite quimicamente induzida por TNBS.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Complexo Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina-metil-jasmonato (HP $\beta$ CD-MeJA).

O complexo de inclusão molecular HP $\beta$ CD-MeJA foi obtido pelo método de coprecipitação, sendo que o metil jasmonato (MeJA) 95% fornecido pela Sigma Aldrich® (número CAS 39924-52-2) na concentração de 300 mg/kg foi misturado com a Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), na proporção de 1:1 (peso/peso). Para obtenção das diluições adicionou-se 26 g de HP $\beta$ CD para cada 335 mL de água purificada e 4,35 mL de MeJA para cada 150 mL de etanol. Após a dissolução, a mistura foi agitada por quatro horas (40°C) e 150 g (aceleração gravitacional). Em seguida, a mistura foi transferida para o rotaevaporador (40°C) para eliminação total do etanol e mantida em repouso até a temperatura de 25°C e agitada por 60 minutos e, a seguir, congelada e liofilizada para obter o complexo em pó.

2.2. *Animais.* Foram utilizados 35 ratos albinos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com 90 dias de idade, e peso corporal médio de 365 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR, Brasil). Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12 horas), sob temperatura estável ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), receberam ração sólida padrão NUVILAB-NUVITAL (Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizando animais obedeceram aos princípios

éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Parecer 074/2014).

*2.2.1. Indução da colite experimental.* Previamente a indução do modelo de colite experimental os animais permaneceram em jejum por 12 horas com livre acesso a água. Posteriormente, foram anestesiados com tiopental sódico® (40 mg/kg) e receberam aplicação intrarectal de 0,6 ml de solução contendo 0,3 ml de TNBS (Sigma-Aldrich® St Louis/MO, USA) (15 mg) dissolvido em 0,3 ml de etanol 30%. A aplicação foi realizada em dose única por meio de cateter de polietileno, inserido de 6 a 8 cm a partir do ânus, com os ratos suspensos pela cauda. A solução foi instilada lentamente e os animais foram mantidos nesta posição por mais 30 segundos após o término da aplicação para evitar o refluxo da solução aplicada [14].

*2.2.2. Grupos e tratamentos.* Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=7/grupo), discriminados de acordo com as soluções administradas e tratados durante 28 dias. Os animais receberam solução salina 0,9% ou solução TNBS/etanol via enema bem como tratamento diário via gavagem de MeJA (300 mg/kg) diluído em óleo de milho ou MeJA (300 mg/kg) complexado molecularmente com HP $\beta$ CD. Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma (Tabela 1): CC: animais controle que receberam dose única de solução salina (0,9%) via enema e ausência de tratamento; CJ: animais controle que receberam dose única de solução salina (0,9%) via enema e tratados com doses diárias de MeJA isolado (300 mg/kg); TN: animais que receberam dose única de TNBS via enema e ausência de tratamento; TJ: animais que receberam dose única de TNBS via enema e tratados com doses diárias de MeJA isolado (300 mg/kg); TC: animais que receberam dose única de TNBS e tratados com doses diárias de MeJA (300 mg/kg) complexado com HP- $\beta$ -CD. Durante o período experimental foi monitorado diariamente a consistência e a

presença de sangramento nas fezes, hipoatividade e possível piloereção dos animais.

2.2.3. *Morte dos animais.* Os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico® (120mg/Kg) sendo coletado sangue para análise de marcadores de injúria hepática. Posteriormente foram laparatomizados, sendo coletadas amostras do colo distal destinadas a avaliação estereomicroscópica, processamento histológico para avaliação tecidual e imunofluorescência para identificação dos neurônios mioentéricos nitrérgicos. Parte das amostras foram fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -80°C para análises de parâmetros inflamatórios e oxidativos.

2.3. *Dosagens sanguíneas para marcadores de lesão hepática.* Foi coletado por punção cardíaca 4 ml de sangue/animal, centrifugado a 1000 g por 10 min e o sobrenadante (plasma) armazenado em freezer (-60°C) para avaliar a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP). As análises foram realizadas utilizando kits comerciais (Gold Analisa®).

2.4. *Avaliação estereomicroscópica.* Após a remoção, o colo distal foi aberto por incisão longitudinal (na borda mesocólica) e fixado nas extremidades sobre placa de isopor. Na sequência, a superfície intestinal foi lavada com solução salina (0,9%) para a remoção de fezes, crostas de fibrina e outros resíduos. As características observadas na superfície intestinal foram pontuadas de 0 a 13 de acordo com o nível crescente de lesão e do estado dos animais [29].

2.5. *Determinação de marcadores inflamatórios.* Amostras do colo distal foram colocadas em tampão fosfato de sódio (PBS) 50 mM, pH 6,0 contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (p/v) (Sigma Chemical® Co. St. Louis, USA) com auxílio do homogenizador do tipo Van Potter. Em seguida cuidadosamente maceradas e homogeneizadas (5% p:v) em homogeneizador

Homomix. Posteriormente, foram submetidas a banho de ultrassom, aquecidas por duas horas em banho-maria a 60°C e centrifugadas a 5000g, temperatura de 25°C por 10 minutos. O ensaio foi realizado no sobrenadante do homogenato intestinal, utilizando dez microlitros obtido de cada amostra os quais foram pipetados em triplicata em uma microplaca de 96 poços seguindo da adição de 200 µl do reativo de coloração composto por 0.0042g de dihidrocloridrato de o-dianisidina (Sigma Chemical® Co. St. Louis, USA), 22,5 ml de água bidestilada, 2,5 mL de PBS 50 mM, pH 6,0 e 12,5µl de peróxido de hidrogênio (1%). A reação foi bloqueada após 5 minutos adicionando-se 30 µl de acetato de sódio 1,46M. A concentração da enzima foi determinada pela técnica de absorbância de ponto final (DO - 450 nm) utilizando espectrofotômetro de microplacas (Asys Expert Plus®) segundo o método descrito por Krawisz *et al.*, 1983 [30].

Amostras do colo distal foram fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -80°C. Posteriormente, foram maceradas em PBS 4 mM e o sobrenadante utilizado para determinar a produção de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) segundo método de Saleh *et al.*, (1999) [31] como uma medida indireta da concentração de óxido nítrico (NO). Para isto, foram adicionadas 50 µL do sobrenadante em triplicata em uma microplaca de 96 poços. Na sequência, adicionou-se 50 uL de solução de Griess [32] em temperatura ambiente. Após 15 minutos, procedeu-se a leitura da microplaca utilizando leitor de placa de ELISA e comprimento de onda de 550 nm. A produção de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio.

As dosagens das citocinas pró-inflamatórias foram realizadas a partir do sobrenadante preparado a partir do homogenato total do colo distal. Foram dosadas IL-17 (pró-inflamatória) e IL-2 (anti-inflamatória), foram realizadas por meio da técnica de Beads Magnéticas utilizando-se o kit CytometricBeadArray (CBA) em Leitor de Beads Magnéticas (MagPixLuminex®) seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen).

2.6. *Avaliação microscópica da inflamação e fibrose colônica.* Amostras do colo distal foram lavadas em solução salina 0,9%, fixadas por 24 horas em formol 10%, desidratadas em séries ascendente de álcoois, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina para a obtenção de cortes histológicos longitudinais semi-seriados com 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Posteriormente foram corados pelo método de Hematoxilina & Eosina, e utilizados para avaliar a intensidade microscópica da inflamação, a qual foi graduada semi-quantitativamente (modificado de Boyer *et al.*, 2005 [33]).

Cortes histológicos foram corados com a técnica de Picrosirius utilizando o corante Sirius-red e contracorados com hematoxilina para avaliar a área ocupada por fibras colágenas do tipo I e III em microscópio com luz polarizada. A análise foi realizada na túnica submucosa em 30 imagens/animal perfazendo o total de 1.697,04  $\mu\text{m}^2$ , em objetiva de 20 vezes. Estas imagens foram digitalizadas e analisadas com software de Image Pro Plus®, version 4.5 (Media Cybernetics, USA).

2.7. *Imunofluorescência dos neurônios nitrérgicos nNOS+.* Amostras do colo distal, foram lavados com solução PBS 0,1 M (pH 7.4) e fixadas por 3 horas à temperatura ambiente em solução de paraformaldeído 4%. Após fixação, o tecido foi aberto ao longo da borda mesocólica e armazenados em solução PBS 0,1 M com azida sódica 0.08% a 4°C. Posteriormente, as amostras foram dissecadas sob estereomicroscópio, obtendo-se preparados totais da túnica muscular que foram lavados com PBS 0,1 e com Triton X-100 0,5% (PBS-T) e imersos por 1 hora em solução contendo PBS-T, BSA 2% e soro de burro 20%, para evitar ligações imunes inespecíficas.

A imunomarcção ocorreu por meio da incubação dos tecidos com o anticorpo primário anti-nNOS, produzido em coelho, utilizado na diluição de 1:400, durante 48 horas. Após a incubação, as membranas foram lavadas em



PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário, Alexa Fluor anti-coelho 488 por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos foram lavados com PBS, para retirada do excesso de anticorpos, sendo montados entre lâmina e lamínula com antifade Gold Prolong®.

Para a quantificação da subpopulação nitrérgica nNOS+, foi utilizado microscópio de fluorescência Olympus FSX-100, sendo capturadas, por amostragem aleatória, 50 imagens microscópicas por animal, utilizando objetiva de 20x, perfazendo a área total de análise de 7.2 mm<sup>2</sup>/animal. Para a análise morfológica neuronal foram mensuradas aleatoriamente as áreas (µm<sup>2</sup>) de 100 corpos celulares/animal (500 neurônios por grupo). As mensurações foram realizadas com auxílio do sistema de análises de imagens (Image-Pro Plus 4.5).

*2.8. Determinação do estado oxidativo intestinal.* Amostras do colo distal clampeadas e armazenadas em nitrogênio líquido a -180°C foram pesados e homogeneizados (10% P/V) em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) com auxílio do homogeneizador tipo Van Potter. Uma alíquota foi separada para uso como homogenato total. O restante do homogenato foi centrifugado à 10.000g por 15 minutos e o sobrenadante aliqotado como fração solúvel do homogenato. O conteúdo protéico do homogenato total e do sobrenadante obtido após centrifugação foi determinado [34], utilizando albumina bovina como padrão.

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), espectrofotometricamente em 532 nm conforme descrito por Ohkawa *et al.*, 1999 [35], com modificações Bhattacharya *et al.*, 2003 [36]. A quantidade de lipoperóxidos foi calculada a partir de uma curva padrão com 1,1,3,3 tetraetoxiparano e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Os níveis de ROS foram quantificados no sobrenadante do homogenato por espectrofluorimetria, via 2,7dichlorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

(504 nm para excitação e 529 nm para emissão) conforme descrito por Siqueira *et al.*, 2005 [37]. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína com base em uma curva padrão preparada com diclorofluoresceína oxidada (DCF).

O sobrenadante do homogenato foi utilizado para quantificação espectrofotométrica da atividade das enzimas antioxidantes, glutathiona-peroxidase (GPx) e catalase (CAT) e pró-oxidantes, xantina-oxidase (XO). A atividade da XO foi avaliada em espectrofotômetro por aumento da absorbância em 295 nm devido a formação de ácido úrico [38]. A atividade de GPx foi determinada a 340 nm por meio do consumo de NADPH na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), GSH e glutathiona redutase [39] e os resultados expressos em nmol/min/mg de proteína. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada pela decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm e os resultados expressos em µm/min/mg de proteínas conforme descrito por Aebi *et al.*, 1974 [40].

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foi quantificadas por espectrofluorimetria (350 nm para excitação e 420 nm para emissão) no homogenato total por meio de um ensaio com phitaladeído (OPT), conforme descrito por Hissin e Hilf, 1976 [41], com modificações (Pardo-Andreu *et al.*, 2007 [42] a partir do homogenato total. Curvas padrão foram preparadas com GSH e GSSG e os conteúdos foram expressos em nmol/mg de proteína.

*2.9. Análises estatísticas.* Os dados numéricos foram inicialmente submetidos ao teste Kolmogorov Smirnov (K-S) para a verificação da normalidade. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's. Dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (one-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. Foi utilizado o software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), e os resultados expressos como média ± erro padrão e nível de significância  $p < 0.05$ .

### **3. Resultados**

*3.1. Sintomas Clínicos.* Após a instilação de TNBS, em todos os animais dos grupos TN, TJ e TC, constatou-se piloereção, fezes diarreicas e sangramento, sendo que a piloereção manteve-se associada a ocorrência de diarreia. Durante os sete dias posteriores à instilação os sintomas diferiram quanto à intensidade e duração entre os grupos, sendo mais evidentes no grupo TN.

No grupo TN foi registrado a ocorrência de fezes diarreicas e piloereção (54%) e sangramento (67%) nos animais, 72 horas após a instilação de TNBS. Do quarto ao sexto dia observou-se sangramento em 50% dos animais.

Animais que receberam tratamento com metil jasmonato isolado (TJ) apresentaram fezes diarreicas e piloereção (31%) e sangramento (7%) apenas nas primeiras 24 horas. Enquanto que os animais que receberam como tratamento o metil jasmonato complexado (TC) apresentaram fezes diarreicas e Piloereção na proporção de 50, 25 e 8%, após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Foi observado sangramento em 30% dos animais após 24 horas.

A partir da segunda semana os sintomas clínicos como diarreia e piloereção (grupos TN, TJ e TC) tornaram-se esporádicos, sem sangramento. Ratos que não receberam instilação com TNBS (grupos CC e CJ), não desenvolveram os sinais clínicos descritos.

*3.2. Marcadores plasmáticos de lesão hepática.* A atividade plasmática da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) em animais controles e colíticos estão representadas na figura 1. Nenhuma modificações nesses parâmetros foram encontradas em consequência do tratamento com MeJA e nem mesmo em função da colite induzida por TNBS.

*3.3. Avaliação estereomicroscópica.* A tabela 2 apresenta a avaliação do grau de lesão da superfície colônica. Constatamos que os animais dos grupos controles (CC e CJ) não apresentaram danos morfológicos visíveis, no entanto, o grupo TN difere estatisticamente dos grupos controles ( $p < 0.05$ ). No colo distal dos

animais do grupo TN foram observadas lesões que variaram desde hiperemia até ulcerações, e presença pontual de áreas com crostas esbranquiçadas e purulentas. No grupo TJ foram observadas regiões com ulcerações pontuais e hiperemia e no grupo TC poucos pontos hiperêmicos. Ambos os grupos não diferiram estatisticamente dos grupos controles e TN (Figura 2.)

*3.4. Determinação de marcadores inflamatórios.* A avaliação da atividade da enzima MPO (Tabela 3) foi utilizada como um marcador indireto da infiltração de leucócitos no colo distal de animais submetidos ao modelo de colite experimental quimicamente induzida. Após a instilação de TNBS, houve um aumento na concentração da enzima MPO no grupo TN quando comparado aos grupos CC (+32,44%) ( $p>0.05$ ) e CJ (+ 594%) ( $p<0.05$ ). O tratamento com metil jasmonato isolado (grupo TJ) reduziu a atividade da enzima MPO (-45,24%), por outro lado, o tratamento com o produto complexado (grupo TC) não alterou a atividade da enzima comparado ao grupo TNBS sem tratamento ( $p>0.05$ ). O grupo CJ reduziu os níveis de MPO quando comparados ao grupo CC.

A concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante do homogenato do colo distal, não diferiu estatisticamente entre os grupos (Tabela 3).

A administração de TNBS no colo distal aumentou a concentração da citocina pró-inflamatória IL-17, no entanto, o tratamento com MeJA isolado foi mais eficiente quando comparado ao MeJA complexado com CDs na redução dos níveis de IL-17. Com relação a citocina pró-inflamatória IL-2 reduzida após a administração de TNBS, apenas o tratamento MeJA isolado foi capaz de promover um aumento nos níveis de IL-2 ( $p<0.05$ ). (Tabela 3).

*3.5. Avaliação microscópica.* A tabela 4 apresenta a avaliação microscópica [33] do colo distal obtida nos diferentes grupos experimentais. A parede intestinal dos grupos controles (CC e CJ) apresentaram organização histológica padrão.

Presença de criptas alongadas revestidas por epitélio simples cilíndrico e abundância de células caliciformes; túnica submucosa com fibras colágenas organizadas como tecido conjuntivo moderadamente denso; túnica muscular externa íntegra composta por duas camadas musculares entre as quais evidenciava-se os gânglios mioentéricos e túnica serosa reduzida e distinta (Figura 3A). Estes grupos não apresentaram diferenças entre si na pontuação do escore ( $p < 0.05$ ), sendo preservada a arquitetura da parede intestinal (Tabela 4).

O colo distal dos animais do grupo TNBS não tratados apresentou desestruturação da parede intestinal, infiltrados inflamatórios extensos e transmurais, presença de criptas distorcidas, cistos e abscessos formando ulcerações e submucosa desenvolvida (Figura 3B). Os gânglios mioentéricos apresentavam morfologia típica no entanto com a presença de PMNs ao redor e no interior dos gânglios (Figura 3C). Estas características resultaram no escore elevado com diferença estatística ( $p < 0.05$ ) quando comparado aos grupos CC e CJ.

Nos grupos TJ e TC a parede intestinal apresentava-se parcialmente recuperada assemelhando-se aos grupos CC, CJ e TN ( $p < 0.05$ ). Não foram observadas inflamações transmurais, entretanto, regiões com erosão epitelial na mucosa foram mantidas principalmente no grupo TC (Figura 3D).

*3.6. Avaliação de fibrose colônica.* A figura 4 apresenta os resultados referentes ao desenvolvimento da fibrose colônica na túnica submucosa. A instilação de TNBS no colo distal promoveu um aumento na deposição de fibras colágenas do tipo I no grupo TN ( $p < 0.05$ ). No grupo TJ foi verificado predomínio de fibras colágenas do tipo III em comparação ao grupo TN ( $p < 0.05$ ).

*3.7. Imunofluorescência dos neurônios mioentéricos nitrérgicos ( $nNOS^+$ ).* Os neurônios mioentéricos encontravam-se organizados em gânglios, e os neurônios nitrérgicos localizados predominantemente na periferia ganglionar independente do grupo experimental (Figura 5A).

Houve aumento na densidade neuronal nitrérgica após a administração de TNBS (TN), quando comparado aos grupos controle (CC e CJ) e também no grupo TN, indicando efeito positivo da administração oral de MeJA isolado (TJ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 5B).

Com relação à morfometria do corpo celular (perfil), constatou-se que no modelo de colite (TNBS) a média era significativamente maior quando comparado aos grupos tratados com MeJA isolado (CJ e TJ), entretanto sem efeito com o MeJA complexado (TC) (Figura 5C).

*3.8. Determinação do estado oxidativo.* A lesão oxidativa tecidual foi avaliada pelos níveis de TBARS no homogenato total do colo distal. Como observado na figura 5A, os animais que receberam TNBS (TN) apresentaram um aumento dos níveis de TBARS em relação aos grupos controles (CC e CJ). Este aumento foi de aproximadamente 291%. O tratamento com MeJA isolado (TJ) como complexado com CDs (TC) reduziram os níveis de TBARS em 85% e 81% respectivamente, em relação ao grupo TN.

O conteúdo de ROS foi determinado no sobrenadante do homogenato e os resultados estão apresentados na figura 5B. O grupo TN apresentou maiores níveis de ROS em comparação aos grupos CC (+ 35%) e CJ (107%). Após a administração de MeJA isolado (TJ), houve uma redução neste conteúdo em 52% nos animais comparado ao grupo TN, para níveis semelhantes a valores próximos ao grupo controle tratado com MeJA (CJ) ( $p > 0.05$ ). Já, o tratamento com MeJA complexado com CDs (TC) reduziu o conteúdo de ROS em 23% no grupo tratado ( $p < 0.05$ ), comparado a TN. Houve diferença do tratamento entre ambas formas de apresentação do MeJA.

Embora não tenha sido encontrada diferença na atividade da XO entre animais dos grupos TN, CC e TC, o tratamento com MeJA isolado foi capaz de reduzir a atividade desta enzima tanto na condição controle (CJ) como na condição inflamada (TJ). Quando analisados apenas os grupos controles, CJ

apresenta redução de 33% na atividade da XO em comparação a CC. Já o grupo TJ apresentou uma redução de 37.5% em relação ao grupo TN (Tabela 5).

Com relação ao sistema antioxidante endógeno verificamos que não houve diferença na atividade da enzima CAT em nenhum dos grupos, porém a atividade da enzima GPx foi reduzida no grupo TN quando comparado aos grupos CC (- 23%) e CJ (- 34%). Somente o tratamento com MeJA complexado com CDs (TC), elevou a atividade dessa enzima ( $p < 0.05$ ), para níveis próximos aos controles (Tabela 5).

A tabela 6 apresenta os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no homogenato do colo distal de ratos. A administração de TNBS reduziu os níveis de GSH em 47% com relação ao grupo CC e 36% em relação ao CJ. O tratamento com MeJA, isolado ou complexado com CDs (TC), não interferiu significativamente em relação ao grupo TN.

O conteúdo de GSSG foi semelhante para os grupos CC e TN. Já o tratamento com MeJA isolado reduziu o conteúdo de GSSG em 32% no grupo CJ em relação ao CC, bem como em 41% no grupo TJ em relação ao grupo TN. O tratamento com MeJA complexado aumentou 15% com relação ao TN.

#### 4. **Discussão**

No presente trabalho, evidenciou-se o potencial efeito do MeJA sobre o modelo experimental de DIIs induzido por TNBS. O MeJA inibiu a migração de células inflamatórias bem como modulou a síntese e liberação de citocinas, regulando negativamente a citocina pró-inflamatória IL-17 e positivamente IL-2, citocina anti-inflamatória. Associado a redução do processo inflamatório, o MeJA demonstrou um potencial efeito antioxidante, foi capaz de manter a subpopulação de neurônios nitrérgicos nNOS+ dentro da normalidade e ainda impediu o desenvolvimento de fibrose colônica. Todos estes efeitos resultaram na melhora de padrões fisiológicos e clínicos.

As doenças inflamatórias intestinais assim como o modelo de indução de colite experimental induzido quimicamente pela instilação do TNBS são caracterizadas por um intenso processo inflamatório. Apresenta um aumento na concentração de radicais livres e produção de citocinas pró-inflamatórias e redução dos níveis de citocinas anti-inflamatórias bem como dos sistemas antioxidantes.

A busca por fármacos eficientes para o tratamento das DIIs tem como principal objetivo, reduzir os efeitos fisiopatológicos e colaterais provocados pelo quadro de remissão e manifestações clínicas agudas e crônicas dessas doenças [43]. Para a redução desses efeitos a molécula biologicamente ativa de escolha foi o metil jasmonato (MeJA).

Estruturalmente, a via de biossíntese dos jasmonatos, sendo análoga aos eicosanóides, é semelhante a das prostaglandinas anti-inflamatórias em animais. Estudos prévios demonstram que os jasmonatos apresentam efeitos neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório, pois inibem a liberação de mediadores inflamatórios [4]. As DIIs alteram diretamente o metabolismo dos eicosanóides que são sintetizados a partir dos ácidos graxos essenciais como ácido araquidônico (AA), promovendo modificações nos receptores do epitélio intestinal, diretamente relacionados aos processos de proliferação, diferenciação e apoptose, contribuindo para o desenvolvimento da DII e do câncer colorretal.

No modelo de colite proposto a instilação de TNBS por um período de 28 dias produziu inflamações na parede colônica produzindo alterações morfoestruturais na arquitetura intestinal com características semelhantes as DIIs, também evidenciadas em período agudo [15]. As principais moléculas que destroem a mucosa colônica são os radicais livres provenientes do metabolismo do oxigênio e liberados via neutrófilos, ativando a enzima MPO contribuindo para a formação de sítios inflamatórios no colo [44].

A administração de MeJA na dose de escolha 300 mg/kg isolado ou complexado com CDs não induziu hepatotoxicidade nos animais. Nossos



resultados corroboram com aqueles encontrados no teste de toxicidade aguda, por Umukoro e Olugbemide, 2011 [45] que constataram que a aplicação de MeJA via intraperitoneal foi bem tolerado, nas doses de 100 até 300 mg / kg em ratos.

Em nosso estudo, foi possível observar redução na atividade da enzima MPO tecidual após o tratamento com MeJA isolado demonstrando seu potencial anti-inflamatório. A enzima MPO usualmente encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é um marcador enzimático inflamatório, relacionada a respostas envolvendo a infiltração de PMN, gerando intermediários reativos como o ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio considerados oxidantes citotóxicos que promovem danos oxidativos em proteínas e lipídeos, aumentando à inflamação e o estresse oxidativo [46].

A resposta ao nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), marcador indireto de inflamação, ocorreu tanto pelo agente indutor como pelo tratamento e decorre diretamente da ativação da enzima iNOS (óxido nítrico induzível) diretamente controlada por macrófagos e neutrófilos expressos durante um processo inflamatório. Em nosso modelo de inflamação, bem como, o tratamento com MeJA, não influenciou a produção de nitrito.

Aumento na atividade da enzima NO sintase no sítio de inflamação em pacientes com colite ulcerativa está diretamente ligado a expressão iNOS a qual é sintetizada a partir de neutrófilos ou macrófagos [47, 48]. Neste sentido, consideramos que os resultados obtidos com relação a manutenção dos níveis expressos de nitrito nos animais administrados com TNBS com ou sem tratamento esteja relacionado ao mecanismo de ação das células do sistema fagocítico como os macrófagos e neutrófilos. Os resultados obtidos para MPO, marcador direto para neutrófilos [14], revela elevação para os grupos inflamados e diminuição nos níveis desta enzima após o tratamento com MeJA, todavia, apesar desta redução o tecido apresenta ainda infiltração tecidual de neutrófilos,

o que nos permite inferir resposta inespecífica da enzima NO neste modelo de inflamação.

A severidade das lesões transmuralis, que incluem a deposição irregular de fibras colágenas na túnica submucosa e invasão de polimorfonucleares nos gânglios mioentéricos desencadeadas pela colite, estão relacionadas à ativação das células T helper do tipo 1 e do tipo 17 (Th1/Th17) [49]. A linhagem Th1 é responsável por ativar células T efetoras atacando o tecido e produzindo citocinas inflamatórias. A resposta Th17 controla a inflamação no tecido, estimulando além da expressão de citocinas inflamatórias, a síntese de quimiocinas e MMPs (metaloproteinases de matriz), recrutando neutrófilos e outras células [50].

O tratamento dos animais com MeJA isolado e complexado com CDs inibiu a produção de IL-17. A inibição de IL-17 resulta na diminuição da produção de MMPs que degradam o tecido durante a inflamação [50]. Adicionalmente a administração do enema contendo TNBS, os níveis teciduais de IL-2, uma citocina anti-inflamatória no modelo de colite foi significativamente diminuída. Ao mesmo tempo, o tratamento com MeJA isolado inclusive nos animais do grupo controle aumentaram os níveis de IL-2.

Resultados semelhantes foram encontrados com a utilização de um análogo dos jasmonatos, o 2-hidroxiacetil 5-cloro-4,5-didehidrojasmonato (J11-Cl) no modelo de colite experimental induzida por DSS no qual houve um aumento na produção de IL-2 [12]. A IL-2 é necessária para manutenção das células T regulatórias, é também, importante na regulação de IL-6, resultando na inibição da diferenciação das células Th17 [12, 50].

Em nosso estudo constatamos que os níveis expressos de MPO e IL-17 foram regulados negativamente e o nível de IL-2 foi regulado positivamente. Nossa hipótese para a resposta anti-inflamatória obtida é a de que a utilização de MeJA isolado interfere no recrutamento de leucócitos e diminui a expressão de IL-17 com maior eficiência que o MeJA complexado, atuante na inibição de IL-

17 e não apresentando resultados na regulação negativa de MPO. Demonstramos também um aumento na expressão de IL-2 após a administração de MeJA isolado. Quando aumentada, a IL-2 diminui a expressão de IL-6 que por sua vez aumenta a resposta de células Th17, produzindo IL-17 [12, 51]. Neste sentido, além do bloqueio de IL-17, o bloqueio de IL-6 seria uma efetiva alternativa terapêutica no tratamento das DIIs promovido pelo MeJA isolado ao regular positivamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-2

Um aumento na migração de células da resposta imune inata como os neutrófilos, células dendríticas e macrófagos para o tecido intestinal aumentam a expressão de ROS que amplificam a inflamação, a lesão tecidual e aumentam a permeabilidade de células epiteliais. A resposta anti-inflamatória que o MeJA isolado apresenta é importante para minimizar o desenvolvimento de ulcerações na mucosa. As principais características histopatológicas observadas em um quadro de manifestação da colite ulcerativa englobam aumento na infiltração de neutrófilos na lâmina própria e nas criptas, formação de micro abscessos e depleção de mucinas produzidas pelas células caliciformes [52].

Os resultados obtidos indicam que o tratamento com MeJA impediu o desenvolvimento de fibrose, principalmente quando administrado de forma isolada. Um quadro patológico de fibrose pode resultar em câncer colorretal devido a predisposição de genes, citocinas e alterações na matriz extracelular ou pela interação entre todos estes fatores. A resposta positiva do MeJA isolado remodelando a matriz extracelular pode ser associada a um controle na deposição de fibras colágenas do tipo I e tipo III na parede intestinal e favorece a manutenção da síntese de fibroblastos impedindo a mudança do fenótipo dos enterócitos que durante um processo de fibrose colônica, desaparecem e são substituídos por células intersticiais promovendo a fibrose colônica [7].

Constatamos que o tratamento crônico com MeJA isolado impediu o desenvolvimento da fibrose colônica, pois manteve a área ocupada por fibras colágenas do tipo I aos grupos controles e produção efetiva de fibras colágenas

imaturas do tipo III, favorecendo o processo de reparo no tecido colônico de maneira ordenada.

O modelo de colite quimicamente induzida por TNBS é considerado um importante modelo para obtenção de resultados que detalham as principais características morfológicas, imunológicas, e que também provocam alterações na inervação intrínseca intestinal [9, 53]. O estresse oxidativo e a diminuição dos sistemas antioxidantes também afetam os neurônios que são muito vulneráveis aos danos provocados pelos radicais livres, principalmente quando os níveis de GSH diminuem [54].

A subpopulação nitrérgica, expressa óxido nítrico (NO), neurotransmissor associado a processos patológicos e fisiológicos, com função inibitória na musculatura lisa local, podendo gerar diferentes padrões de motilidade colônica. Segundo Aulí *et al.*, 2008 [55]. É comum ocorrer redução da motilidade do colo associada a aumento da expressão de neurônios mioentéricos nitrérgicos em animais com colite.

A crescente produção de NO pode estar relacionada ao estresse causado pelo modelo experimental que leva ao aumento da atividade metabólica, pois ele também é um neurotransmissor e protetor do trato gastrointestinal [56]. Como resultado de respostas adaptativas a diferentes tipos de estímulos/condições, os neurônios entéricos são capazes de alterar seu fenótipo estrutural, funcional ou químico, a fim de manter a homeostase das funções intestinais [57].

O aumento da expressão do NO pode resultar em mudanças fenotípicas no plexo mioentérico [58], levando a hiperplasia da subpopulação nitrérgica, como observado no presente trabalho, onde a administração de TNBS resultou em aumento no número da subpopulação mioentérica nitrérgica (NOS) sem efeito do MeJA complexado com CDs. Ressalte-se que existem variações no tipo de resposta conforme o estágio de inflamação, com redução da densidade neuronal mioentérica na colite aguda (5 dias) [33] e hiperplasia neuronal na colite crônica (30 dias) obtida por Poli *et al.*, (2001) [59]. Considerando que os neurônios

nitrérgicos são categorizados como mais resistentes a injúrias teciduais, o aumento da densidade e/ou variações morfométricas dessa subpopulação pode refletir uma tentativa de controle da resposta inflamatória pelo organismo. Essa possibilidade se estende de forma menos evidente ao maior perfil celular obtido no grupo TN quando comparado aos grupos CJ e TJ.

Constatamos que o tratamento com MeJA isolado demonstra potencial em manter a densidade da subpopulação neuronal nitrérgica comparada aos grupos não inflamados, garantindo o funcionamento do plexo mioentérico, contribuindo para a neuroproteção do SNE durante os quadros de remissão e manifestações das DIIs. Atribuímos este efeito a diminuição da infiltração de leucócitos no plexo mioentérico comprovado pela diminuição nos níveis da enzima MPO e aumento do conteúdo do sistema antioxidante da enzima GSH.

Nossos resultados são semelhantes aqueles encontrados por Stevely e colaboradores (2015) que observaram alterações no número e nas dimensões morfométricas da subpopulação nitrérgica em cobaias. Ensaio anteriores também relataram aumento da expressão do número de nNOS em neurônios do sistema nervoso central (SNC) em resposta a estímulos inflamatórios [60, 61].

O estresse oxidativo é um dos fatores etiológicos ligados a variados sinais e sintomas das DIIs que incluem dor abdominal, diarreia e megacólon tóxico [62]. A instilação de TNBS promoveu aumento na lipoperoxidação lipídica e na produção de ROS. A administração de MeJA isolado ou complexado com CDs foi capaz de reduzir a lipoperoxidação lipídica e inibir o conteúdo de ROS, no entanto, o MeJA isolado se mostrou mais eficiente que o complexado. Com relação à atividade da enzima pró-oxidante XO (xantina oxidase), apenas o MeJA isolado foi capaz de diminuir a atividade dessa enzima.

O trato gastrointestinal apresenta grandes concentrações de XO [63], durante estados patológicos, o XO circulante se liga as células endoteliais produzindo lesões oxidativas específicas no tecido intestinal [64]. A função catalítica da XO envolve a oxidação de hipoxantina para xantina e de xantina

para ácido úrico, ambas as reações geram o ânion superóxido. A XO também é capaz de produzir ânion superóxido ao combinar-se com células fagocíticas, envolvendo também ativação de neutrófilos em uma série de reações chamada de “*Burst oxidativo*” que altera a membrana plasmática tornando-a impermeável [10, 54].

Os neutrófilos produzem além do ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio durante a fagocitose, estas substâncias são responsáveis por aumentar a produção de ROS, o principal gatilho para o estresse oxidativo e produção de enzimas proteolíticas [10, 54, 65]. A combinação ROS e enzimas proteolíticas atuam sobre as células endoteliais, diminuindo os sistemas de defesas antioxidantes, causando alterações na permeabilidade da barreira epitelial, possibilitando a invasão de antígenos luminiais que causam aumento ainda maior no volume do infiltrado inflamatório, confluindo assim para necrose da mucosa intestinal e manutenção das ulcerações [65].

Ao mesmo tempo, o ânion superóxido também pode ser convertido em peróxido de hidrogênio e ambos se acumularem no sítio inflamatório causando a peroxidação lipídica [10, 54, 65]. Na patogênese da DII, os peróxidos lipídicos aumentam o estresse oxidativo devido a sua alta reatividade com as proteínas e ácidos graxos [65]. Os produtos de peroxidação lipídica estão associados também ao aumento da atividade da enzima MPO [10].

Comprovamos a ação do MeJA sobre o estado oxidativo na modelo de colite experimental em ratos. Acreditamos que a liberação modificada e lenta do MeJA pelo complexo de inclusão com CDs não seja tão eficiente quanto a administração do MeJA isolado na diminuição de ROS, pois a redução com a droga isolada foi mais eficiente. A peroxidação lipídica foi três vezes menor que o grupo sem tratamento após a administração de MeJA isolado ou complexado.

Na avaliação do processo de decomposição do peróxido de hidrogênio, avaliados pelos sistemas enzimáticos antioxidantes CAT e GPx, constatamos que na modulação da atividade da enzima GPx, o MeJA isolado foi menos

eficiente do que o MeJA complexado com CDs, que aumentou a atividade dessa enzima.

A GPx é muito importante na proteção das células contra os efeitos deletérios da decomposição de peróxidos [54], para tal efeito, ela necessita da glutathiona reduzida como um doador de prótons [10]. A GPx converte GSH um importante cofator enzimático doador de elétrons na mucosa intestinal em GSSG e durante este processo reduz peróxido de hidrogênio em água e hidroxiperóxidos lipídicos. Os níveis de GPx elevados desempenham um importante papel como antioxidantes enzimáticos endógenos com uma função importante na redução de  $H_2O_2$  em água e ROOH [54].

O tratamento utilizando MeJA isolado demonstrou ação antioxidante mais eficiente que o MeJA complexado com CDs ao promover a redução de GSSG. Os radicais livres gerados durante o estresse oxidativo são usualmente destruídos pelos sistemas de defesa antioxidantes podendo apresentar mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. A enzima glutathiona atua como um dos principais antioxidantes não enzimáticos encontrados no organismo, presentes em sua forma reduzida (GSH).

A homeostasia de GSH no tecido saudável é dependente da regeneração de GSSG, onde a redução de GSSG na presença de NADPH leva a síntese de duas moléculas GSH. A alta concentração de GSH nas no tecido colônico previne a degradação do tecido ao eliminar peróxidos prejudiciais. Nossos resultados estão de acordo com diferentes modelos experimentais nos quais o MeJA promoveu um aumento dos níveis de GSH reduzindo o estresse oxidativo no tecido cerebral [23,66] e atenuou o processo de neurodegeneração em camundongos [66].

## 5. Conclusão

O modelo de colite experimental induzido pelo TNBS em ratos comprova a eficácia do mesmo, evidenciando as características mimetizadas pelas doenças inflamatórias intestinais em humanos. A administração oral de MeJA isolado demonstrou maior eficiência que o MeJA complexado com as ciclodextrinas, constatado pela redução dos parâmetros inflamatórios e oxidativos, impedindo alterações teciduais como o desenvolvimento de fibrose colônica. De forma inédita, o tratamento com MeJA isolado revelou atividade anti-neuro-inflamatória nitrérgica. Considerando as respostas teciduais, oxidativas e inflamatórias, e levando em consideração que na dose de 300 mg/Kg não houveram danos hepatotóxicos. O MeJA representa um novo fármaco com potencial terapêutico no tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

## 6. Abreviações

AJ – Ácido Jasmônico.  
ALP - Fosfatase Alcalina.  
ALT – Alanina aminotransferase.  
ANOVA – Análise de Variância.  
AST – Aspartato aminotransferase.  
BSA- Albumina de Soro Bovino.  
CAT – Catalase.  
CDs – Ciclodextrinas.  
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.  
COX-2 –Cicloxigenase -2.  
DC – Doença de Crohn.  
DCFH-DA - 2,7dichlorofluoresceina Diacetato.  
DIIs – Doenças Inflamatórias Intestinais.  
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.  
GPx – Glutaciona peroxidase.  
GSH- Glutaciona Reduzida.  
GSSG – Glutaciona Oxidada.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio.  
HP-β-CD – Hidróxi-propil-beta-ciclodextrinas.  
IL-1β – Interleucina 1-beta.  
IL-2 – Interleucina 2.  
IL-6 – Interleucina 6.



IL -12 Inteleucina 12.  
IL-17 - Interleucina 17.  
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível.  
JA – Jasmonato.  
K-S – Kolmogorov-Smirnov.  
MeJA – Metil Jasmonato.  
MMPs – Metaloproteinases de Matriz.  
MPO – Mieloperoxidase.  
NADPH - Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina.  
NFκB - Fator nuclear kappa B.  
nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neuronal.  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito.  
PBS – Tampão Fosfato Salino.  
ROOH – Hidroxiperoxídeos Lipídicos  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio.  
RPM – Rotação Por Minuto.  
SNC – Sistema Nervoso Central.  
SNE – Sistema Nervoso Entérico.  
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.  
TNBS – Ácido Trinitrobenzenosulfônico.  
TNFα- Fator de Necrose Tumoral alfa.  
XO – Xantina-Oxidase.

## 7. Conflito de interesse

Os autores afirmam que não têm conflito de interesse sobre o presente trabalho.

## 8. Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por doações da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX e Fundação Araucária J. C. F. Besson foi bolsista do Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 9. Referências Bibliográficas.

- [1] R. Reifen, A. Karlinsky, A. H. Stark, Z. Berkovitch and A. Nyska. “alpha-Linolenic acid (ALA) is an anti-inflammatory agent in inflammatory bowel disease”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, n<sup>o</sup>. 12, pp. 1632–1640, 2015.
- [2] P. Zorilla, A. Rodriguez-Nogales, F. Algieri et al., “Intestinal anti-inflammatory activity of the polyphenolic-enriched extract Amanda<sup>®</sup> in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis”, *Journal of Functional Foods*, vol. 11, pp. 449–459, 2014.
- [3] X. Liu and J. Wang. “Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 2, pp. 780–787, 2011.
- [4] J. C. F. Besson, C. C. Picoli, G. Matioli and M. R. M. Natali. “Methyl jasmonate: a phytohormone with potential for the treatment of inflammatory bowel diseases”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 70, no. 2, pp. 178–190, 2018.
- [5] M. Sezikli, Z. A. Cetinkaya, F. Güzelbulut and D. O. Yetkin. “Metabolic Syndrome in Inflammatory Bowel disease: A real relationship or just a coincidence”, *Euroasean Journal of Hepato-Gastroenterology*, vol. 2, no. 2, pp. 79–83, 2012.
- [6] N. E. Joseph and C. R. Weber. “Pathology of Inflammatory Bowel Disease” *In: Baumgart D. (eds) Crohn's Disease and Ulcerative Colitis, Springer, Cham.* pp. 243–258, 2012.
- [7] N. Lu, H. Zhao, M. Jing et al., “The pharmacodynamic active components study of Tibetan medicine *Gentianopsis paludosa* on ulcerative colitis fibrosis”, *International Immunopharmacology*, vol. 46, pp. 163–169, 2017.
- [8] N. I. Kochar, A. V. Chandewal, R. L. Bakal et al., “Nitric oxide and the Gastrointestinal Tract”, *International Journal of Pharmacology*, vol.7, no. 1, pp. 31–39, 2011.
- [9] R. Stavely, A. M. Robinson, S. Miller et al., “Allogeneic guinea pig mesenchymal stem cells ameliorate neurological changes in experimental colitis”, *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 6, no. 1, pp. 1–21, 2015.
- [10] A. Piechota-Polanczyk and J. Fichna. “Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases”, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. vol. 387, no. 7, pp. 605-620, 2014.
- [11] L. Camacho-Basquero, I. Villegas, J. M. Sánchez-Calvo et al., “Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis”, *International Immunopharmacology*, vol.7, no. 3, pp. 333-342, 2007.
- [12] J. Choo, Y. Lee, X. Yan et al., “A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)  $\gamma$  Agonist 2-Hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate

exerts anti-inflammatory effects in colitis”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 42, pp. 25609-25619, 2015.

[13] A. R. Jurjus, N. N. Khoury, J. Reimund. “Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacological and toxicological methods*, vol. 50, no. 2, pp. 81-92, 2004.

[14] G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M R Szewczuk, J. L. Wallace. “Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon”, *Journal of Gastroenterology*, vol.96, no. 3, pp. 795-803, 1989.

[15] C. C. M. Gonçalves, L. Hernandez, C. A. Bersani-Amado et al., “Use of propolis hydroalcoholic extract to treat colitis experimentally induced in rats by 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1-11, 2013.

[16] S. Cohen and E. Flescher. “Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug”. *Phytochemistry*, vol. 70, no. 13, pp. 1600-1609, 2009.

[17] B. A. Vick and D. C. Zimmerman. “Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species”. *Plant Physiology*, vol. 75, no. 2, pp. 458-461, 1984.

[18] M. G. Shivshankar and T. S. Shanmugarajan. “Methyl jasmonate: new insights into a potent phytohormone”. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol. 7, no. 1, pp. 244-249, 2016.

[19] S. Y. Wang, L. Bowman and M. Ding. “Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells”, *Food Chemistry*, vol. 107, no. 3, pp. 1261-1269, 2008.

[20] H. T. Dang, H. J. Lee, E. S. Yoo et al., “New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 24, pp. 10228-10235, 2008.

[21] M. C. Parra-Lobato, N. Fernandez-Garcia, E. Olmos, M. C. Alvarez-Tinaut, M. C. Gómez-Jiménez. “Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings”, *Environmental and Experimental Botany*. vol.66, no. 1, pp. 9-17, 2009.

[22] H. J. Lee, K. Maeng, H. T. Dang et al., “Anti-inflammatory effect of methyl dehydrojasmonate (J2) is mediated by the NF- $\kappa$ B pathway”, *Journal of Molecular Medicine*, vol. 89, no. 1, pp. 83-90, 2011.

[23] A. T. Eduviere, S. Umukoro, A. O. Aderibigbe, A. M. Ajayi, F. A. Adewole. “Methyl jasmonate enhances memory performance through inhibition of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in mice”. *Life Science*. vol. 132, pp. 20-26, 2015.

[24] A. T. Eduviere, S. Umukoro, O. A. Adeoluwa, I. A. Omogbiya, O. M. Aluko. “Possible mechanisms involved in attenuation of lipopolysaccharide-induced memory deficits by methyl jasmonate in mice”, *Neurochemical Research*, vol. 41, no. 12, pp. 3239-3249, 2016.

[25] U. Solomon and E. A. Taghogo. “Methyl jasmonate attenuates memory dysfunction and decreases brain levels of biomarkers of neuroinflammation

induced by lipopolysaccharide in mice”, *Brain Research Bulletin*, vol. 131, pp. 133-141, 2017.

[26] E. E. Farmer, C. A. Ryan. “Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, no. 19, pp. 7713-7716, 1990.

[27] A. R. Prado, F. Yokaichiya, M. K. K. D Franco et al., “Complexation of oxethazaine with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: increased drug solubility, decreased cytotoxicity and analgesia at inflamed tissues”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 69, no. 6, pp. 652-662, 2017.

[28] J. C. F. Besson, L. Hernandez, J. M. Campos et al., “Insulin complexed with cyclodextrins stimulates epithelialization and neovascularization of skin wound healing in rats”, *Injury*, vol. 48, no.11, pp. 2417-2425, 2017.

[29] C. B. Appleyard and J. L. Wallace. “Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs”, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 269, no. 1, pp. 119-125, 1995.

[30] J. E. Krawisz, P. Sharon and W. F. Stenson. “Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models”, *Gastroenterology*, vol. 87, no. 6, pp. 1334-1350, 1984.

[31] T. S. F. Saleh, J. B. Calixto and Y. S. “Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan”, *Peptides*, vol. 20, no. 8, pp. 949–956, 1999.

[32] S. Basu and B. Hazra. “Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases”, *Phytotherapy Research*, vol. 20, no. 10, pp. 896-900, 2006.

[33] L. Boyer, M. Ghoreishi, V. Templeman et al., “Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis”, *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, vol. 117, no. 1, pp. 41-53, 2005.

[34] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. “Protein measurement with the Folin phenol reagent”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265-275, 2005.

[35] H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi. “Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction”, *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351-358, 1979.

[36] A. Battacharya, R. A. Lawrence, A. Krishnan et al., “Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice”, *Analytical Biochemistry*, vol. 22, no. 5, pp. 388-399, 2003.

- [37] I. R. Siqueira, C. Fochesatto, I. L. S. Torres et al., "Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats", *Life Science*, vol. 78, no. 3, pp. 271-278, 2005.
- [38] J. Galilea, E. I. Canela and J. Bozal. "The course analysis of guanine and hypoxanthine transformation to uric acid by bovine liver guanine aminohydrolase and xanthine oxidase", *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 12, no. 1, pp. 27-36, 1981.
- [39] A. L. Tappel. "Glutathione peroxidase and hydroperoxides", *Methods in Enzymology*, vol. 52, pp. 506-513, 1978.
- [40] H. Aebi, S. R. Wyss, B. Scherz, S. Skvaril. "Catalase", *Methods in Enzymatic Analysis*, vol. 2, pp. 673-684, 1974.
- [41] P. J. Hissin and R. Hilf. "A fluorometric method for determination of oxidized", *Analytical Biochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 214-226, 1976.
- [42] G. L. Pardo-Andreu, R. A. Cavalheiro, D. J. Dorta et al., "Fe (III) shifts the mitochondria permeability transition-eliciting capacity of mangiferin to protection of organelle", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 320, no. 2, pp. 646-653, 2007.
- [43] C.H. Hsiang, H. Y. Lo, H. C. Huang et al., "Ginger extract and zingerone ameliorated trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice via modulation of nuclear factor- $\kappa$ B activity and interleukin-1 $\beta$  signalling pathway", *Food Chemistry*, vol. 136, pp. 170-177, 2013.
- [44] K. V. Viana-Cardoso, M. T. B. Silva, A. A. Peixoto-Junior et al., "Sensory and inflammatory colonic changes induced by vincristine in distinct rat models of colitis", *Autonomic & Autocoid Pharmacology*, vol. 34, no. 3-4, pp. 27-34, 2015.
- [45] S. Umukoro and A. S. Olugbemide. "Antinociceptive effects of methyl jasmonate in experimental animals", *Journal of Natural Medicines*, vol. 65, no. 3-4, pp. 466-470, 2011.
- [46] A. Witaicenis, L. N. Seito, A. S. Chagas et al., "Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives", *Phytomedicine*, vol. 21, no. 3, pp. 240-246, 2014.
- [47] S. J. Middleton, M. Shorthouse and J. Q. Hunter. "Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis", *The Lancet*, vol. 349, no 8843, pp.465-466, 1993.
- [48] N. K. Boughton-Smith. Pathological and therapeutic implications for nitric oxide in inflammatory bowel disease, *Journal Royal of Society of Medicine*, vol. 87, no.6, pp.312-314, 1994.
- [49] J. W. Park, H. Bae, G. Lee and B. G. Hong. "Prophylactic effects of *Lonicera japonica* extract on dextran sulphate sodium-induced colitis in a mouse model by the inhibition of the Th1/Th17 response", *British Journal of Nutrition*, vol.109, no. 2, pp. 283-292, 2013.
- [50] J. M. Damsker, A. M. Hansen and R. R. Caspi, "Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1183, pp. 211-221, 2011.

- [51] W. Strober and I. J. Fuss. “Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases”, *Gastroenterology*, vol. 140, no. 6, pp. 1756-1767, 2011.
- [52] R. J. Xavier and D. K. Podolsky. “Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease”, *Nature*, vol. 448, pp. 427-434, 2007.
- [53] M. V. Silva, A. R. Marosti, C. E. Mendes et al., “Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons”, *Histochemistry Cell Biology*, vol. 143, pp. 171-184, 2015.
- [54] A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay, S. Mitra and S. E. Crowe. “Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases”, *Physiological Reviews*, vol. 94, no. 2, pp. 329-354, 2014.
- [55] M. Aulí, Y. Nasse, W. Ho. et al. “Neuromuscular changes in a rat model of colitis”, *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, vol. 141, no. 1-2, pp. 10-21, 2008.
- [56] J. B. Furness. “The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies”. *Neurogastroenterology and Motility*. vol. 20, no. 1, pp. 32-38, 2008.
- [57] A. E. Lomax, E. Fernández, K. A. Sharkey. “Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation”, *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 17, no.1, pp. 4-15, 2005.
- [58] M. K. Jarvinen, W. J. Wollmann, T. A. Powrozek, J. A. Schultz and T. L. Powley. “Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density”, *Anatomy and Embryology*, vol. 199, no. 2, pp. 99-112. 1999.
- [59] E. Poli, M. Lazzaretti, D. Grandi, C. Pozzoli and G. Coruzzi. “Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis”, *Neurochemical Research*, vol. 26, no.8-9, pp. 1085-1093, 2001.
- [60] G. Di Girolamo, M. Farina and M. L. Riberio et al., “Effects of cyclooxygenase inhibitor pretreatment on nitric oxide production, nNOS and iNOS expression in rat cerebellum”, *British Journal of Pharmacology*, vol. 139, no. 6, pp. 1164-1170, 2003.
- [61] J. Wu, Q. Lin, Y. Lu, W. D. Willis and K. N. Westlund. M. L. Riberio et al., “Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis”, *Experimental Brain Research*, vol. 118, no. 4, pp. 457-465, 1998.
- [62] R. M. Moura, R. M. Hartmann, F. Licks et al., “Antioxidant effect of mesalazine in the experimental colitis model induced by acetic acid”, *Journal of Coloproctology*, vol. 36, no. 3, pp. 139-148, 2016.
- [63] D. V. Van, T. J. Tuinstra, A. Bast. “Modulation of oxidative stress in the gastrointestinal tract and effect on rat intestinal motility”, *Biochemical Pharmacology*, vol. 38, no 17, pp. 2807–2818, 1989.

- [64] S. Tan, Y. Yokoyama, E. Dickens et al., "Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 15, no. 4, pp. 407-414. 1993
- [65] Z. Wang, S. Li, Y. Cao et al., "Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, 2016.
- [66] S. Umukoro, O. M. Aluko, A. T. Eduviere and O. Owoeye. "Evaluation of adaptogenic-like property of methyl jasmonate in mice exposed to unpredictable chronic mild stress", *Brain Research Bulletin*, vol. 121, pp. 105-114, 2016.

Tabela 1 – Perfil de distribuição dos ratos Wistar (n=7) em cada grupo experimental, de acordo com o tipo de solução administrada via gavagem ou enema.

Grupo/tratamento	Sigla
Controle (enema com salina) e sem tratamento	CC
Controle (enema com salina) e tratamento via gavagem com metil jasmonato isolado (300 mg/kg)	CJ
TNBS (enema com TNBS) e sem tratamento	TN
TNBS (enema com TNBS) e tratamento via gavagem com metil jasmonato isolado (300 mg/kg)	TJ
TNBS (enema com TNBS) e tratamento via gavagem com o complexo de inclusão molecular-Metil jasmonato-HP $\beta$ CD(HP $\beta$ CD-MeJA 300 mg/kg)	TC



Tabela 2. Avaliação semi-quantitativa sob estereomicroscópio do colo distal de ratos (n=5/grupo) dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Escore (0-13)*					
(0) Sem danos					
(1) Hiperemia localizada sem ulcerações					
(2) Ulcerações com pouca hiperemia e sem espessamento da parede.					
(3) Ulcerações com inflamação em apenas um local.					
(4) Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação.					
(5) Dois ou mais sítios maiores de inflamação e ulceração, ou um sítio maior de inflamação e ulceração estendendo-se por mais que 1 cm de comprimento.					
(6-10) Se o dano for maior que 2 cm de comprimento, adiciona-se 1 ponto a cada cm envolvido a mais:					
Mais:					
(0) Sem adesões intestinais;					
(1) Com adesões intestinais;					
(0) Sem diarreia;					
(1) Com diarreia;					
(2) Com diarreia sanguinolenta;					
Grupos	CC	CJ	TN	TJ	TC
Média	0.60 $\pm$	0.55 $\pm$	3.00 $\pm$	1.30 $\pm$	0.80 $\pm$
EPM	0.25a	0.18a	0.27b	0.44ab	0.12ab

(\*) Adaptado de Appleyard e Wallace (1995). Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ). Teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn`s.

Tabela 3. Determinação de marcadores inflamatórios pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) (n=5/grupo), concentração de nitrito (n=6/grupo) e concentração de citocinas (n=4/grupo) no colo distal de ratos (n=5/grupo) dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Marcador Inflamatório	MPO* (pg/mg)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ** (pg/mg)	IL-17** (pg/mg)	IL-2** (pg/mg)
CC	0.262 $\pm$ 0.053 ab	0.82 $\pm$ 0.27 a	43.15 $\pm$ 5.10 a	1.507 $\pm$ 0.22 ab
CJ	0.050 $\pm$ 0.023 a	0.58 $\pm$ 0.15 a	39.43 $\pm$ 3.56 a	1.935 $\pm$ 0.29 a
TN	0.347 $\pm$ 0.077 b	0.73 $\pm$ 0.25 a	75.77 $\pm$ 10.79 b	0.804 $\pm$ 0.16 b
TJ	0.190 $\pm$ 0.070 ab	0.55 $\pm$ 0.21 a	39.55 $\pm$ 5.97 a	1.436 $\pm$ 0.10 ab
TC	0.392 $\pm$ 0.081 b	0.90 $\pm$ 0.14 a	42.70 $\pm$ 5.17 a	0.728 $\pm$ 0.01 b

(\* ) Teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn`s. (\*\* ) Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0.05).

Tabela 4. Avaliação microscópica no colo distal de ratos (n=5/grupo) dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Resultados expressos em média ± erro padrão.

<b>Escore (0-8)*</b>					
Perda da arquitetura da mucosa					
(0) Ausente					
(1) Leve					
(2) Moderada					
(3) Severa					
Extensão do infiltrado inflamatório celular					
(0) Ausente					
(1) Pequena – túnica mucosa					
(2) Média – túnica submucosa					
(3) Intensa – transmural					
Formação de abscessos nas criptas					
(0) Ausente					
(1) Presente					
Intensidade e dilatação de vasos sanguíneos e presença de eritrócitos					
(0) Padrão					
(1) Elevada					
Grupos	CC	CJ	TN	TJ	TC
Média	0.72±	0.97±	1.73±	1.35±	1.47±
EPM	0.13a	0.12a	0.08b	0.06 ab	0.18ab

(\*) Adaptado de Boyer *et al.*, 2005. Teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn`s. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0.05).

Tabela 5 – Atividade da enzima pró-oxidante xantina-oxidase (XO) e antioxidante catalase (CAT) e Glutaciona-peroxidase (GPx) em nmols/mg de proteína no sobrenadante do homogenato do colo distal de ratos (n=4-7/grupo) dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Enzima	XO* (nmol/min.mg proteína)	CAT* (nmol/min.mg proteína)	GPx* (nmol/min.mg proteína)
CC	21.25 $\pm$ 0.71 ab	17.867 $\pm$ 1.14 a	103.000 $\pm$ 5.01 a
CJ	14.28 $\pm$ 1.61 c	19.211 $\pm$ 1.57 a	119.969 $\pm$ 3.85 a
TN	24.00 $\pm$ 1.70 a	17.865 $\pm$ 0.83 a	79.627 $\pm$ 5.86 b
TJ	15.02 $\pm$ 1.86 bc	19.275 $\pm$ 1.74 a	63.890 $\pm$ 3.42 b
TC	22.08 $\pm$ 1.10a	18.157 $\pm$ 1.78 a	114.732 $\pm$ 6.65 a

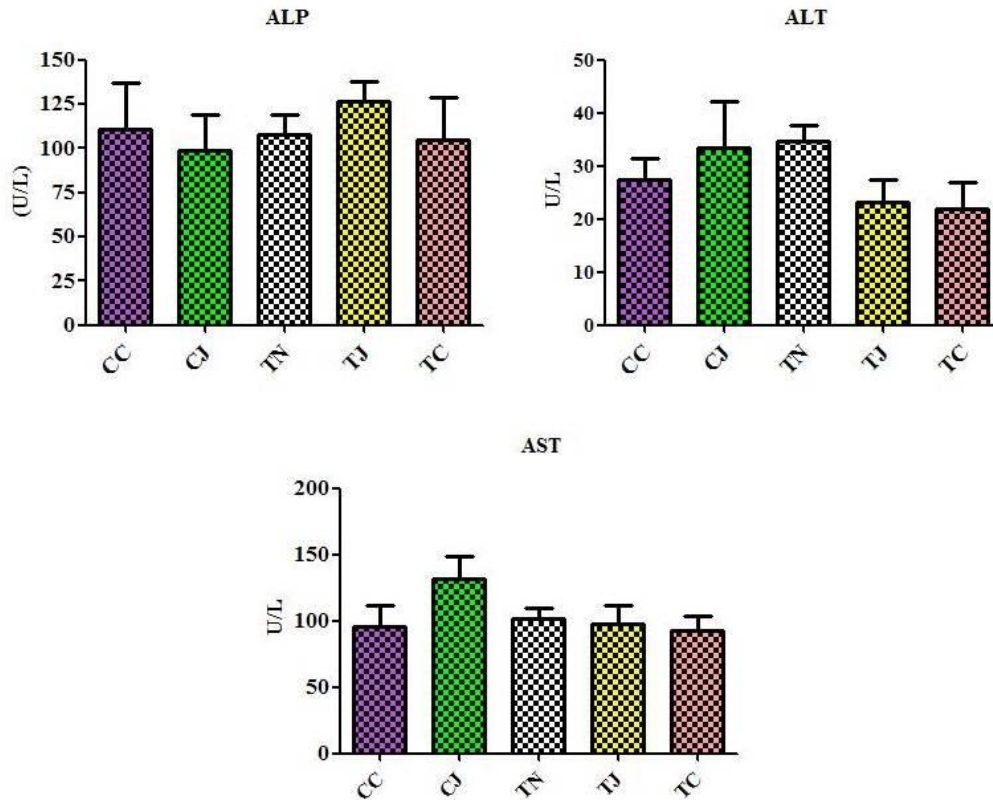
(\*) Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística. Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey (p<0.05).

Tabela 6 – Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no homogenato do colo distal de ratos (n=4-7/grupo) dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

	GSH*	GSSG*
CC	13.440 $\pm$ 1.53 a	2.61 $\pm$ 0.20 a
CJ	11.140 $\pm$ 0.91 a	1.77 $\pm$ 0.11 b
TN	7.150 $\pm$ 0.18 b	2.63 $\pm$ 0.16 a
TJ	10.074 $\pm$ 1.86 ab	1.55 $\pm$ 0.10b
TC	9.195 $\pm$ 0.070 b	3.02 $\pm$ 0.19 a

(\*) Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística. Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Figura 1. Marcadores de injúria hepática (ALP, ALT e AST) em ratos (n=5/grupo) dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.



Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Figura 2. Colo distal de ratos dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: (A) grupo salina (CC); (B) grupo salina e MeJA (CJ); (C) grupo TNBS (TN); (D) grupo TNBS e MeJA isolado (TJ) e (E) TNBS e MeJA complexado com CDs (TC).

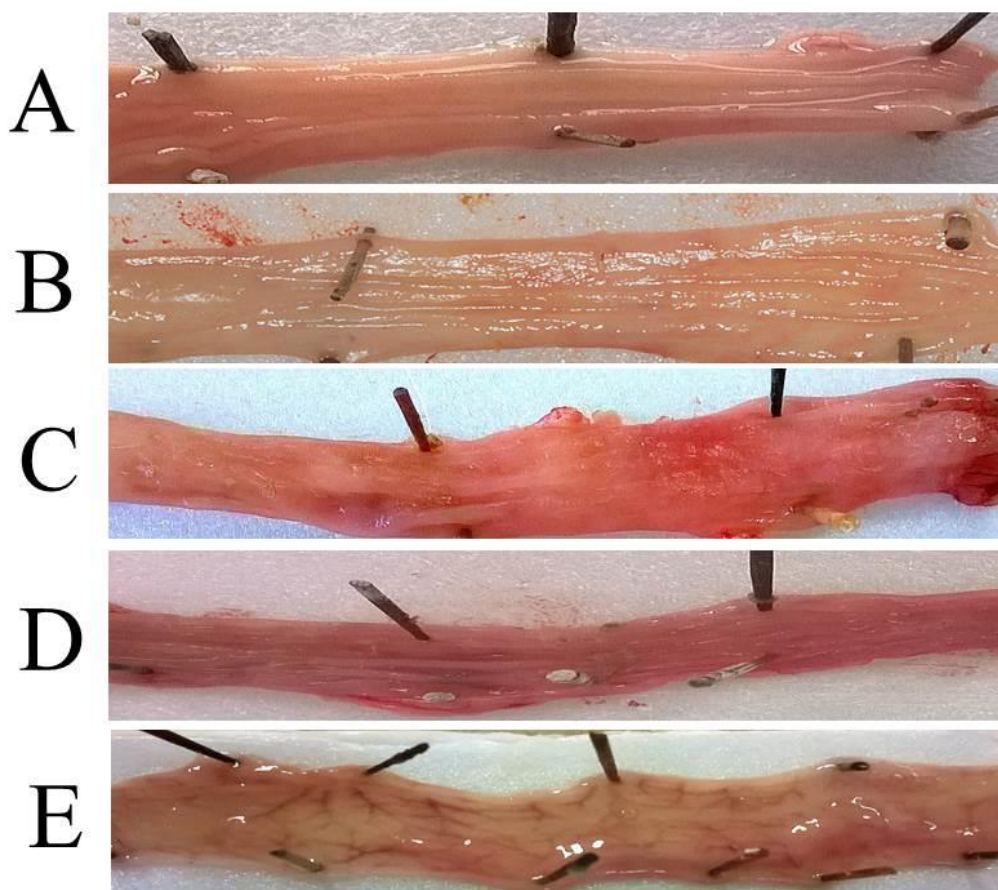




Figura 3. Fotomicrografia do colo distal de ratos dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Controle com características histológicas padrão (m=mucosa, sm= submucosa e mu=muscular), (A) objetiva 10 X. Grupo TN com intenso infiltrado inflamatório transmural e espessamento da túnica submucosa (B), objetiva 10 X. Parede colônica do grupo TJ evidenciando mucosa padrão com acúmulo de linfócitos entre as criptas e espessamento na túnica submucosa (D), objetiva 10 X. (D) A ponta da seta indica uma área de ulceração em gânglio mioentérico no grupo TN contendo PMNs (setas), objetiva de 40 X. Hematoxilina e Eosina.

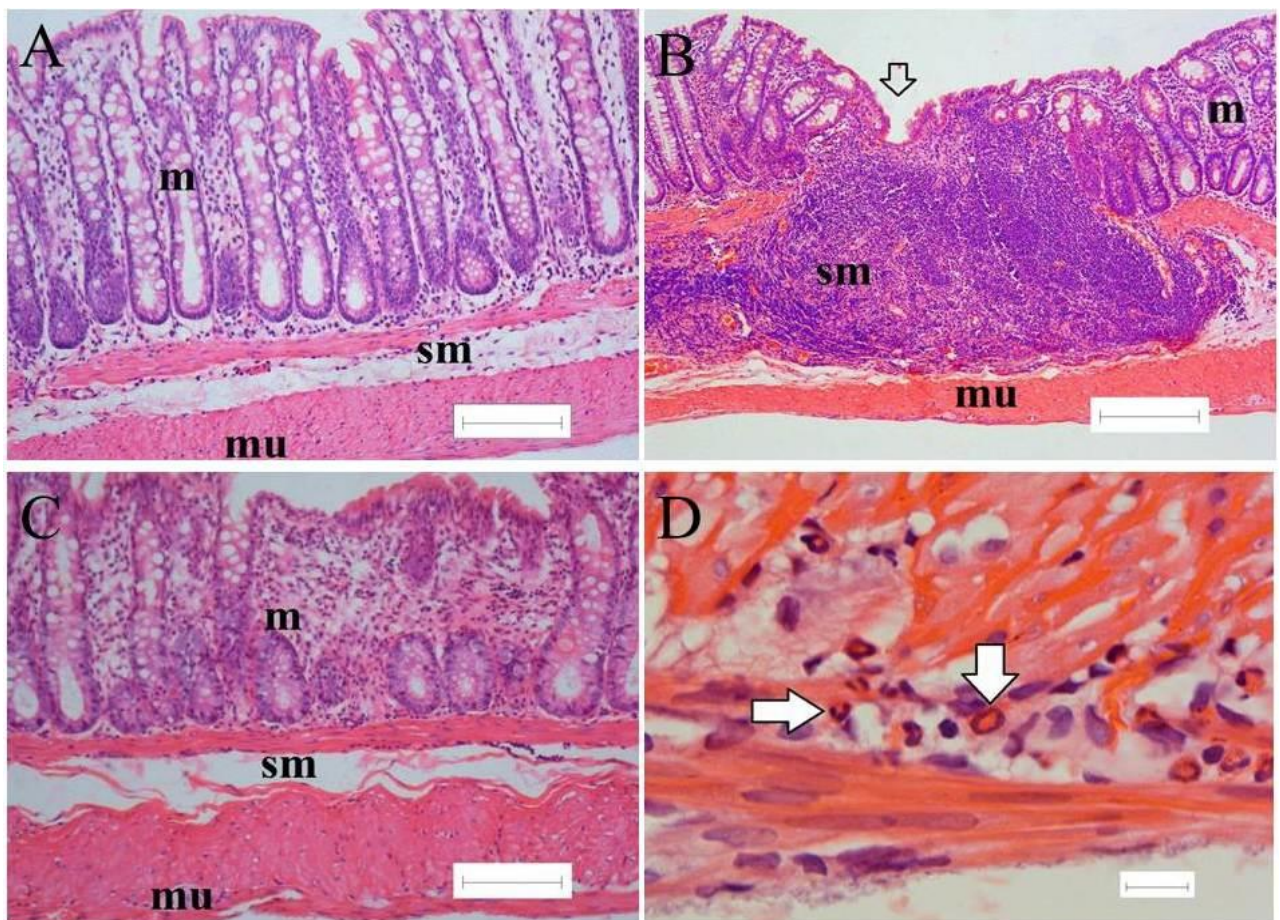
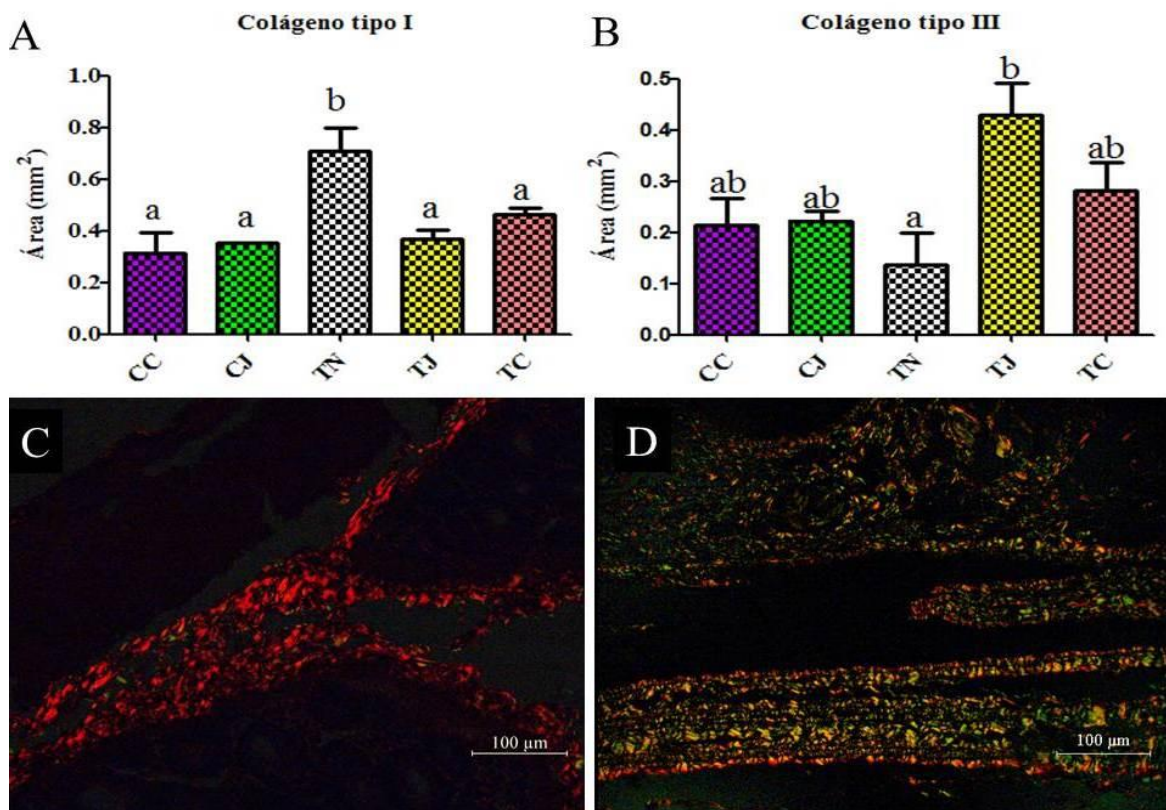


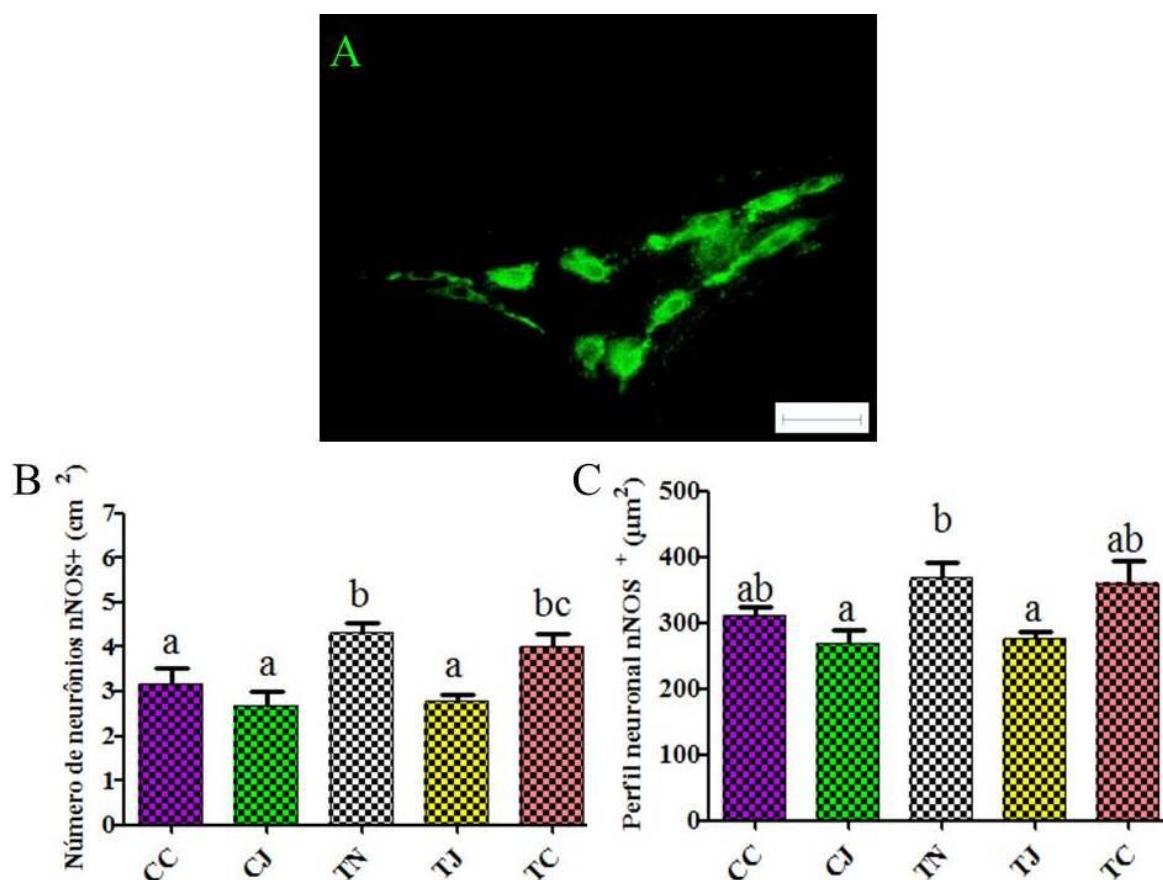


Figura 4 –Avaliação de fibrose colônica e fotomicrografia do colo distal de ratos dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC) (n=5 / grupo). A figura A indica a quantificação de colágeno tipo I enquanto a figura B a quantificação de colágeno tipo III, as figuras C e D ilustram a deposição das fibras colágenas tipo I e III respectivamente dispostas na túnica submucosa. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Coloração Sirius-Red, objetiva 10 X.



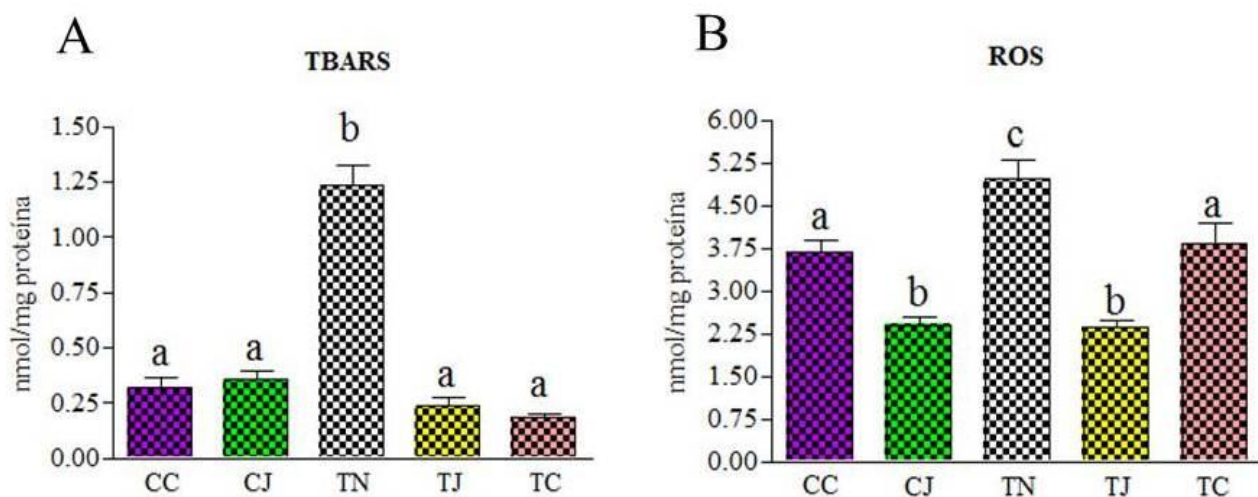
Letras distintas indicam diferenças estatísticas. Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Figura 5. Fotomicrografia dos neurônios mioentéricos nitrérgicos do colo distal de ratos dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC) (nNOS+) (n=5/grupo). A figura A evidencia a imunomarcação da subpopulação nNOS, objetiva 20 X. As figuras B e C indicam respectivamente o quantificação de neurônios e perfil neuronal (nNOS+). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.



Letras distintas indicam diferenças estatísticas. Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Figura 5 – Níveis do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da peroxidação lipídica (TBARS) no colo distal de ratos dos grupos que receberam soluções via enema e tratamento via gavagem durante 28 dias, como segue: salina (CC); salina e MeJA (CJ); TNBS (TN); TNBS e MeJA isolado (TJ) e TNBS e MeJA complexado com CDs (TC). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=6-7/grupo).



Letras distintas indicam diferenças estatísticas. Análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## **ANEXO**

### Normas para elaboração de manuscritos – OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY.

1 – Formatting: An optional research article manuscript template can be downloaded here. We recommend that all manuscripts follow the structure below:

2 - Title and Authorship Information: The following information should be included:

3 - Manuscript title: Full author names, full institutional mailing addresses and e-mail addresses

4 – Abstract: The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained, citation-free, and should not exceed 300 words.

5 – Introduction: This section should be succinct, with no subheadings.

6 - Materials and Methods: This part should contain sufficient detail that would enable all procedures to be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

7 - Results and Discussion: This section may be divided into subsections or may be combined.

8 – Conclusions: This should clearly explain the main conclusions of the article, highlighting its importance and relevance.

9 - Data Availability (excluding Review articles): This statement should describe how readers can access the data supporting the conclusions of the study and clearly outline the reasons why unavailable data cannot be released. For guidance on composing a Data Availability statement, including template examples, please see here.

10 - Conflicts of Interest: Authors must declare all relevant interests that could be perceived as conflicting. Authors should explain why each interest may represent a conflict. If no conflicts exist, the authors should state this. Submitting authors are responsible for coauthors declaring their interests.

#### 10 - Funding Statement

Authors must state how the research and publication of their article was funded, by naming financially supporting body(s) (written out in full) followed by associated grant number(s) in square brackets (if applicable), for example: “This work was supported by the Engineering and Physical Sciences Research Council [grant numbers xxxx, yyyy]; the National Science Foundation [grant number zzzz]; and a Leverhulme Trust Research Project Grant”.

If the research did not receive specific funding, but was performed as part of the employment of the authors, please name this employer. If the funder was involved in the manuscript writing, editing, approval, or decision to publish, please declare this.

11 – Acknowledgments: All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the manuscript before the references. Anyone who made a contribution to the research or manuscript, but who is not a listed author, should be acknowledged (with their permission).

12 – References: Authors may submit their references in any style. If accepted, these will be reformatted in Chicago style by Hindawi. Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references should be numbered consecutively in the order of their first citation. Citations of references in the text should be identified using numbers in square brackets e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”. All references should be cited within the text and uncited references will be removed.

13: Preparation of Figures: Upon submission of an article, authors should include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the manuscript in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

#### Preparation of Tables

14 - Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

#### Supplementary Materials

15 - Supplementary materials are the additional parts to a manuscript, such as audio files, video clips, or datasets that might be of interest to readers. Authors

can submit one file of supplementary material along with their manuscript through the Manuscript Tracking System. If there is more than one file, they can be uploaded as a .ZIP file.

A section titled “Supplementary Material” should be included before the references list with a concise description for each supplementary material file. Supplementary materials are not modified by our production team. Authors are responsible for providing the final supplementary materials files that will be published along with the article.

16 – Proofs: Corrected proofs must be returned to the publisher within two to three days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication.

17 - Copyright and Permissions: Authors retain the copyright of their manuscripts, and all Open Access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations. The submitting author is responsible for securing any permissions needed for the reuse of copyrighted materials included in the manuscript.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

18 - Conflicts of Interest: Conflicts of interest (COIs, also known as ‘competing interests’) occur when issues outside research could be reasonably perceived to affect the neutrality or objectivity of the work or its assessment. For more information, see our publication ethics policy. Authors must declare all potential interests – whether or not they actually had an influence – in a ‘Conflicts of Interest’ section, which should explain why the interest may be a conflict. If there are none, the authors should state “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.” Submitting authors are responsible for coauthors declaring their interests. Declared conflicts of interest will be considered by the editor and reviewers and included in the published article.

Authors must declare current or recent funding (including for Article Processing Charges) and other payments, goods or services that might influence the work. All funding, whether a conflict or not, must be declared in the “Funding Statement”. The involvement of anyone other than the authors who 1) has an interest in the outcome of the work; 2) is affiliated to an organization with such an interest; or 3) was employed or paid by a funder, in the commissioning, conception, planning, design, conduct, or analysis of the work, the preparation or editing of the manuscript, or the decision to publish must be declared.

19 - Ethical Guidelines: In any studies on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Manuscripts describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects’ understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any



anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.

## **Journal Title**

### **Concise and Informative Article Title**

Firstname M. I. Lastname,<sup>1</sup> Firstname A. Lastname,<sup>2</sup> and Firstname B. Lastname<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department, Institute, City ZIP/Post code, Country.

<sup>2</sup> Department, Institute, City ZIP/Post code, Country.

Correspondence should be addressed to Firstname B. Lastname; lastname@institution.edu

### **Abstract**

The abstract should be a single, self-contained paragraph which summarises the manuscript. Ideally it will provide a brief context for the study, before describing the scientific approach and some key results in a qualitative manner. It should finish with a sentence to describe the implications for the field. The abstract must not include references, figures or tables.

### **Introduction**

The introduction should be succinct, with no subheadings. Limited figures may be included only if they are truly introductory, and contain no new results.

### **Materials and Methods**

The materials and methods section should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It may be divided into headed subsections if several methods are described.

### **Results and Discussion**

#### **Subheadings**

The results and discussion may be presented separately, or in one combined section, and may optionally be divided into headed subsections.

#### **Advice on Equations**

Equations should be provided in a text format, rather than as an image. Microsoft Word's equation tool is acceptable. Equations should be numbered

consecutively, in round brackets, on the right-hand side of the page. They should be referred to as Equation 1, etc. in the main text.

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (1)$$

### Advice on Figures

At the point of submission, authors may provide all figures embedded within the manuscript at a convenient break near to where they are first referenced or, alternatively, they may be provided as separate files. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Where possible, figures should be displayed on a white background. When preparing figures, consider that they can occupy either a single column (half page width) or two columns (full page width), and should be sized accordingly. All figures must have an accompanying caption which includes a title and, preferably, a brief description (see Figure 1).

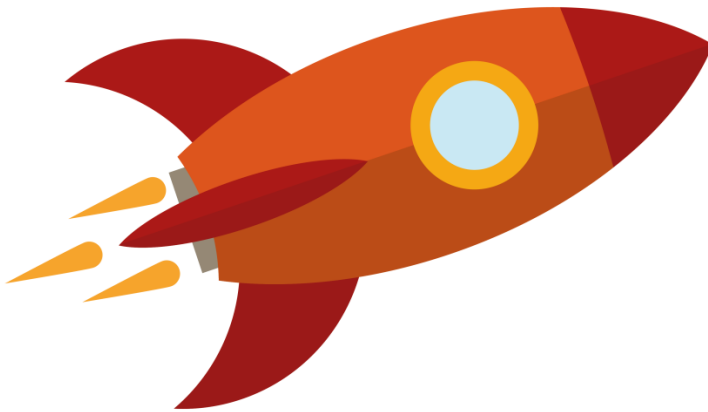


Figure 1: Basic rocket ship design. The rocket ship is propelled with three thrusters and features a single viewing window. The nose cone is detachable upon impact.

The caption can also be used to explain any acronyms used in the figure, as well as providing information on scale bar sizes or other information that cannot be included in the figure itself. Plots that show error bars should include in the caption a description of how the error was calculated and the sample size (see Figure 2).

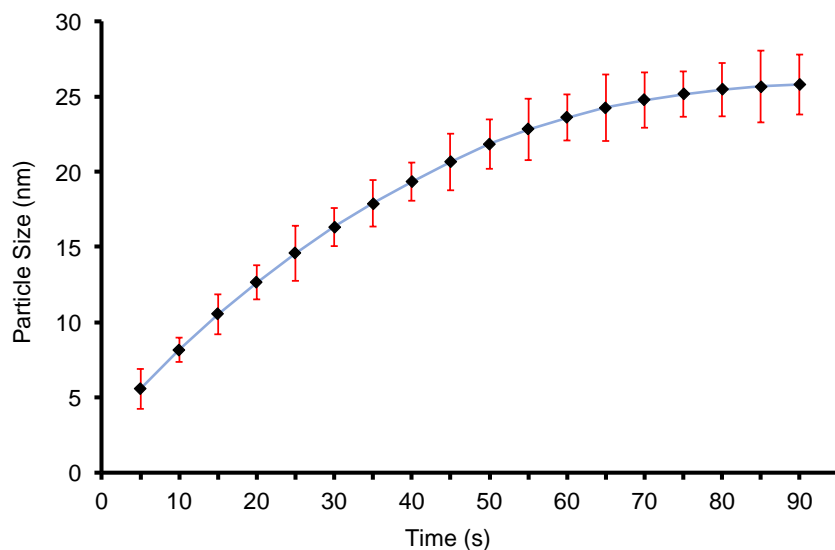


Figure 2: Plot of nanoparticle size with respect to time, recorded over a 90 s period. The error bars represent the standard deviation of measurements for 20 particles in five separate sample runs ( $n = 100$ ).

If a figure consists of multiple panels, they should be ordered logically and labelled with lower case roman letters (i.e., a, b, c, etc.). If it is necessary to mark individual features within a panel (e.g., in Figure 3a), this may be done with lowercase Roman numerals, i, ii, iii, iv, etc. All labels should be explained in the caption. Panels should not be contained within boxes unless strictly necessary.

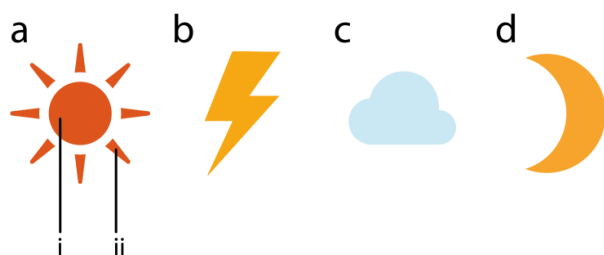


Figure 3: Representations of some common weather symbols. (a) The sun with (i) core, and (ii) rays. (b) Thunder bolt. (c) Cloud. (d) Moon.

Upon acceptance, authors will be asked to provide the figures as separate electronic files. At that stage, figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of at least 300 dpi resolution, unless due to the limited resolution of a scientific instrument. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

## Advice on Tables

Every table must have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used (see Table 1). Tables should be cited consecutively in the text.

Table 1: Temperature and wildlife count in the three areas covered by the study.

Location	T [° C]	Turtles	Sharks	Octopuses	Starfish
Blue Lagoon	21.2	5	3	4	543
Regent's Canal	5.2	8	0	24	312
Shark Bay	12.8	4	7	9	122

## Conclusions

The Conclusions section should clearly explain the main findings and implications of the work, highlighting its importance and relevance.

## Data Availability

A data availability statement is compulsory for research articles and clinical trials. Here, authors must describe how readers can access the data underlying the findings of the study, giving links to online repositories and providing deposition codes where applicable. For more information on how to compose a data availability statement, including template examples, please visit: <https://www.hindawi.com/research.data/#statement>.

## Conflicts of Interest

This section is compulsory. A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts. If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

Some of the information you choose to provide here may constitute your “sensitive personal data”. Please read our [Privacy Policy](#) for further information on how we handle your personal data.

## **Funding Statement**

Authors should state how the research and publication of their article was funded, by naming financially supporting bodies followed by any associated grant numbers in square brackets.

## **Acknowledgments**

An Acknowledgements section is optional and may recognise those individuals who provided help during the research and preparation of the manuscript.

## **Supplementary Materials**

If Supplementary Materials are provided (e.g., audio files, video clips or datasets) they should be described here. Note that authors are responsible for providing the final Supplementary Materials files that will be published along with the article, which are not modified by our production team. You should remember to reference the Supplementary Materials' contents at appropriate points within the manuscript. We recommend citing specific items, rather than referring to the Supplementary Materials in general, for example: "See Figures S1-S10 in the Supplementary Material for comprehensive image analysis."

## **References**

References will be reformatted in house, there is no need to adhere to a specific style at the point of submission. Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All citations in the text must be numbered consecutively in square brackets, before any punctuation, for example, "as discussed by Smith [1]," and "as discussed elsewhere [2,3]." All uncited references will be automatically removed. The references should not contain footnotes. For your information, our citation style is:

[x] Author initials and surname, "Title in sentence style," Journal title, vol. (volume number), no. (issue number), pp. (page numbers separated by an en-dash), Year.

For example:

[1] J. D. Watson and F. H. C. Crick, "A structure for deoxyribose nucleic acid," *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953.

For articles with six or more authors, the first three authors are listed followed by 'et al.'. When journals use only article numbers, no page numbers are necessary. For example:

- [2] B. P. Abbott, R. Abbott, T. D. Abbott et al., "Observation of Gravitational Waves from a Binary Black Hole Merger," *Physical Review Letters*, vol. 116, no. 6, Article ID 061102, 2016.



Parecer emitido após reunião realizada em: 24/7 /2014

Parecer nº 074/2014

Pesquisador: Maria Raquel Marçal Natali

Setor: DCM

Título:

Protocolo nº 026/2014

**Avaliação da resposta tecidual e antioxidante do metil jasmonato na colite experimental induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.**

Entrada: 23/4/2014

Início: 9/7/2014

Término: 28/2/2017

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .**

**Considerações e Parecer:**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM), na sua reunião de 24/07/2014, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pelo(a) pesquisador(a).

Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo,  
Presidente em exercício do CEAE

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado