

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**PEDRO BISCAINO FILHO**

**A MELATONINA NO TUMOR DE EHRLICH: ANALISE  
DA AÇÃO DA MELATONINA NA RELAÇÃO  
PARÊNQUIMA/NECROSE TUMORAIS**

BAURU  
2015

**PEDRO BISCAINO FILHO**

**A MELATONINA NO TUMOR DE EHRLICH: ANALISE  
DA AÇÃO DA MELATONINA NA RELAÇÃO  
PARÊNQUIMA/NECROSE TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentada ao Centro de Ciências da  
Saúde como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas, sob orientação da profa. Dra.  
Dulce Helena Jardim Constantino.

BAURU  
2015

B6213m	<p data-bbox="548 1381 808 1413">Biscaino Filho, Pedro</p> <p data-bbox="548 1444 1284 1570">A melatonina no tumor de Ehrlich: análise da ação da melatonina na relação parênquima/necrose tumorais / Pedro Biscaino Filho. -- 2015. 23f. : il.</p> <p data-bbox="592 1602 1252 1633">Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena J. Constantino.</p> <p data-bbox="548 1665 1284 1759">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1791 1284 1885">1. Oncologia experimental. 2. Tumor de Ehrlich. 3. Melatonina. 4. Necrose. 5. Parênquima. I. Constantino, Dulce Helena Jardim. II. Título.</p>
--------	--

**PEDRO BISCAINO FILHO**

**A MELATONINA NO TUMOR DE EHRLICH: ANALISE  
DA AÇÃO DA MELATONINA NA RELAÇÃO  
PARÊNQUIMA/NECROSE TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

Aprovado em 03 de dezembro de 2015

BANCA EXAMINADORA

---

profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino

---

Ma. Juliana Mercado

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar a vida e poder estar vivenciando esse momento,

Ao minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dulce, por ela abrir meus caminhos. Obrigado  
Querida Mestra!

Ao meu pai que sempre quis me ver crescendo e melhorando cada vez mais,  
“in memoriam”,

À Universidade do Sagrado Coração – USC,

Ao Biotério,

Ao laboratório de Patologia Ambiental e Experimental,

Ao laboratório de Biologia e ao laboratório de Citogenética e Biologia  
Molecular,

Ao comitê de ética ,

Ao grupo de estudo em oncologia experimental (GEONE)

E à farmacêutica Jessica Sabbatine Chimini que sem sua ajuda esse trabalho  
não existiria.

“Viver é fazer- se indelével”.  
(Galdino)

## RESUMO

Com a evolução, os mamíferos adquiriram métodos de delimitar seu relógio biológico, o ritmo circadiano que era regido por dois hormônios principais, a melatonina e o cortisol. A melatonina, o hormônio do sono regula várias funções do corpo como a ativação de fatores de necrose tumoral, com o passar do tempo e com o avanço da civilização as noites começaram a se tornar mais claras, assim tendo efeito contra esse hormônio, causando deficiência e maximizando a função do seu hormônio antagônico, o cortisol, e assim alterando as regulações fomentadas pela melatonina. Tumores malignos são constituídos por uma massa de células neoplásicas, o parênquima tumoral, células tumorais viáveis em crescimento regular e em seu interior a necrose de coagulação, por baixa oxigenação. A melatonina também tem capacidade de diminuir a atividade da telomerase comprometendo as proteções do material genético, assim reduzindo as metástases. Esse estudo buscou avaliar a ação da melatonina no tumor sólido de Ehrlich, um modelo de neoplasia experimental com camundongos, na tentativa de correlacionar o tratamento com melatonina ao crescimento desse tumor em relação do parênquima e da necrose tumoral. Como resultado, os valores de área tumoral, necrose e parênquima (área total: teste:  $52,60 \pm 17,84$  controle:  $59,27 \pm 17,66$ ; área de parênquima: teste:  $27,98 \pm 8,76$  controle:  $31,10 \pm 15,56$ ; área de necrose: teste:  $29,70 \pm 14,41$  controle:  $25,49 \pm 15,48$ .) não foram significativos, sendo necessário um estudo futuro empregando um número maior de animais por grupo o que poderia confirmar ou contrapor os resultados aqui demonstrados.

**Palavras-chave:** Oncologia experimental. Tumor de Ehrlich. Melatonina. Necrose. Parênquima.

## ABSTRACT

With evolution, mammals have acquired the methods to define their biological clock, the circadian rhythm that was governed by two main hormones melatonin and cortisol. Melatonin, the sleep hormone regulates various body functions such as activation of tumor necrosis factors, over time and with the advance of civilization night started to become clearer, thus having effect against this hormone, causing disability and maximizing the function of your antagonistic hormone, cortisol, and thereby altering the regulations fostered by melatonin. Malignant tumors are constituted by a mass of neoplastic cells, tumor parenchyma viable tumor cells in regulating growth and inside a coagulation necrosis for low oxygenation. Melatonin also has ability to decrease telomerase activity affecting the protection of the genetic material, thus reducing metastasis. This study aimed to evaluate the action of melatonin in solid tumor Ehrlich, a model of experimental cancer in mice, trying to correlate treatment with melatonin to the growth of this tumor relative parenchymal and tumor necrosis. As a result, the tumor area values, and parenchymal necrosis (total area: test:  $52.60 \pm 17.84$  control:  $59.27 \pm 17.66$ ; parenchymal area: test:  $27.98 \pm 8.76$  control:  $31.10 \pm 15.56$ ; necrotic area: test:  $29.70 \pm 14.41$  control:  $25.49 \pm 15.48$ ) were not significant, requiring future study involving a larger number of animals per group that could confirm or counteract the results shown here.

**Keywords:** Experimental oncology. Ehrlich tumor. Melatonin. Necrosis. Parenchyma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área total do tumor sólido de Ehrlich .....	15
Figura 2 - Parênquima tumoral.....	16
Figura 3 - Área de necrose.....	17
Figura 4 - tumor de ehrlich .....	18

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	11
2.1	OBJETIVO GERAL .....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	12
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	12
3.2	ANIMAIS .....	13
3.3	NEOPLASIA.....	13
3.4	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....	13
3.5	TRATAMENTO COM MELATONINA.....	14
3.6	EUTANÁSIA.....	14
3.7	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL .....	14
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	15
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	19
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	21
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
	<b>ANEXO A – Comitê de Ética</b> .....	24

## 1 INTRODUÇÃO

Há bilhões de anos os mamíferos desenvolveram métodos endógenos que delimitam o corpo às horas do dia, denominado ritmo circadiano, este está influenciado por períodos de luz e escuridão, ao mesmo tempo em que induz certos hormônios a atuarem no organismo, nos dando disposição como também fazendo reparos gerais.

Com a iluminação artificial e com o avanço da civilização houve uma dessincronização de nosso ritmo circadiano, por este motivo certos hormônios sofreram alterações em sua disponibilidade no nosso organismo bem como em outros mamíferos. Esses hormônios endógenos são principalmente a melatonina e o cortisol. (BLASK, 2009)

A melatonina (MLT), também conhecida como indolamina ou N-acetil-5-metoxitriptamina é um hormônio não esteróidal derivado do aminoácido triptofano e sintetizado a partir da ação da enzima N-acetiltransferase (NAT), produzido na glândula pineal, nas células denominadas pinealocitos (ARENDR, 1994) secretada durante a noite, é o mais potente eliminador de radicais livres endógenos por causa de sua alta afinidade lipídica que consegue se difundir através da membrana plasmática e também tem ação protetora contra imunodepressão estimulada por estresse e altas concentrações hormônios glicocorticoides como o cortisol. (FUCHS, et al., 2010).

Várias funções corporais como o controle do ritmo circadiano de diversos processos fisiológicos, desenvolvimento de câncer e crescimento, padrões de secreção de hormônios, regulação do sistema neuroendócrino, o sistema anti-apoptótico são influenciados pela melatonina e, também, estimula a produção de interleucinas com interleucinas-2 (IL-2) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). (FERREIRA, et al., 2010).

A MLT é um mediador endógeno com ação oncostática em vários tumores, como tumores mamários, leucemia infantil e inibição de proliferação tumoral e metástases, também isso não ocorre apenas in vivo entretanto há uma inibição de crescimento de células parenquimatosas na taxa de 80% em estudo in vitro (COS et al., 1998; LISSONI et al., 2001; MANTOVANI et al., 2001).

Os seus efeitos oncogênicos, particularmente em neoplasias mamárias humano, estão relacionadas com a sua capacidade para supra-regular a expressão de genes envolvidos na expressão do receptor de estrogénio e em xenotransplantes de tumores mamários atuando nos receptores de melatonina para suprimir a formação de monofosfato cíclico de adenosina levando a supressão de ácido linoleico. (BLASK, 2009).

O fator de necrose tumoral (TNF), foi descrito por sua capacidade de induzir a necrose em certos tumores, estimulada por leucotrieno B<sub>4</sub>, é principalmente produzida por macrófagos e pode ter outras atividades como o emagrecimento em infecções parasitárias (FRANCO et al., 2010). Existem dois tipos de TNF, o TNF  $\alpha$  e TNF  $\beta$ . O TNF  $\alpha$  Também conhecido como caquexina, é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos-T principalmente. E também TNF  $\beta$  tendo os mesmos receptores TNFR-1 e TNFR- 2. (OLIVEIRA et al., 2011). O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), reconhecido por sua atividade miogênica para células endoteliais, tem importância significativa no crescimento neoplásico, atuam desde o desprendimento de células endoteliais, até a migração, proliferação e diferenciação, muitos cânceres apresentam essa enzima para a produção de vasos para a nutrição de suas células e metástases. (FRANCO et al., 2010).

O tumor de Ehrlich foi isolado por Ehrlich em 1986 e descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. (D'AGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. 1992). Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais. Histologicamente, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose. Estas são oriundas da morte das células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-inoculação. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são comumente vistas por toda a lâmina. (D'AGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. 1992) O tumor possui poucas células inflamatórias e estroma escasso. Alto índice mitótico e de invasividade caracterizam essa neoplasia, a qual constitui excelente instrumento didático para o entendimento do comportamento dos tumores malignos.

As áreas de necrose ocupam porção central na massa tumoral e quanto mais extensa, mais agressivo e anaplásico é o tumor, pois estão relacionadas a uma “competição” entre células tumorais em franco crescimento por nutrientes e pelo espaço que ocupam. As áreas de necrose são infiltradas por neutrófilos que, acreditava-se apenas ter relação com a remoção das células mortas, porém estudos recentes apontam para um importante papel dos neutrófilos no sentido de sinalizarem para macrófagos e ativarem os mesmos (REIS et al., 2009). Portanto, avaliação da extensão das áreas de necrose é um importante marcador para análise do comportamento da massa tumoral.

Neoplasias malignas, como o tumor de Ehrlich, são caracterizadas por apresentar um parênquima, ou seja, uma região onde células tumorais vivas em fase contínua de proliferação. Nesta região encontramos células atípicas, com núcleos atípicos e multinucleados, caracterizando uma falha no processo de divisão celular durante a anáfase. A hipercromasia, uma intensa afinidade do núcleo pelo corante de caráter ácido (hematoxilina) é marcante em tumores malignos e não é incomum o achado de figuras de mitose e meiose atípicas no interior do parênquima tumoral. Metástases hematogênicas não são próprias do tumor de Ehrlich, porém crescimento secundário em linfonodos é um achado comum. Em modelo induzindo metástases para linfonodo poplíteo (SANTOS; CONSTANTINO, 2015), constatou-se que o tratamento com melatonina reduziu este padrão de progressão metastática. Estudos recentes (dados ainda não publicados) demonstram que o tratamento com melatonina reduz significativamente a fibrinogênio estroma tumoral, podendo ser este também um mecanismo de ação para o controle do crescimento tumoral atribuído à melatonina.

Muito se estuda sobre neoplasia, como cura-las ou reduzir ao mínimo os efeitos de seu desgaste no organismo. A melatonina pode influenciar em vários fatores, especialmente ritmo circadiano, mas também como seus efeitos oncogênicos em carcinomas mamários.

Esse trabalho visa entender a atuação da melatonina na angiogênese no tumor de Ehrlich, mesmo este, sendo um carcinoma mamário, para identificar se a angiogênese induzida por essa neoplasia é alterada.

## **2 OBJETIVOS**

Segue abaixo os objetivos da pesquisa:

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ação da melatonina sobre o desenvolvimento do tumor sólido de Erlich, com foco principal nas dimensões das áreas de necrose e parênquima tumorais

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) avaliar o crescimento tumoral;
- b) quantificar áreas de necrose, parênquima tumorais.

### 3 METODOLOGIA

A metodologia consiste em:

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para realização deste estudo foram empregados vinte camundongos suíços distribuídos em um grupo teste e outro controle, cada um contendo dez animais. Os animais foram selecionados de acordo com a média de seus pesos, sendo o grupo teste com média de 36,31 gramas e o grupo controle com média de 32,40 gramas.

As células neoplásicas foram mantidas “in vivo” por repiques semanais, através do implante de  $10^7$  células tumorais por via intraperitoneal. A suspensão foi ajustada para a concentração de  $10^8$  células tumorais/mL e em seguida realizou-se a contagem das células cujo resultado teve em média 596 células tumorais.

No dorso de cada animal foram inoculados *0,1 ml da solução de células tumorais*, por via subcutânea. Por cerca de vinte e um dias os animais do grupo teste foram tratados com 10mg/kg de melatonina (SIGMA), via oral, 1x/dia e os animais do grupo controle com 0,1ml de solução fisiológica, via oral, 1x/dia.

Decorridos os vinte e um dias, os animais foram eutanasiados em câmara de eutanásia com isoflurano e posteriormente a massa tumoral foi removida e fixada em formol logo após a sua obtenção. Após a secção ao longo do seu maior eixo, uma parte do material foi fixado em parafina, cortado e encaminhado para processamento e coloração pela HE (Hematoxilina-Eosina).

Foi realizada a análise morfométrica do tecido tumoral corado pela HE e com o objetivo de mensurar parâmetros morfométricos. Este protocolo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Sagrado Coração (protocolo nº 11/14).

### 3.2 ANIMAIS

Para realização do presente estudo foram utilizados vinte camundongos suíços, machos, com sessenta dias de idade, obtidos do Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). No decorrer dos experimentos os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, receberam água proveniente do sistema de distribuição de água da Universidade do Sagrado Coração – USC e ração comercial específica para camundongos.

### 3.3 NEOPLASIA

Foi utilizado o Tumor Sólido de Ehrlich, mantido no Biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC. As células neoplásicas foram mantidas “in vivo” por repiques semanais, através do implante de  $10^7$  células tumorais por via intraperitoneal. Na obtenção de inóculos para implante do tumor, o fluído ascítico foi retirado, por punção da cavidade peritoneal, e a suspensão ajustada para a concentração de  $10^8$  células tumorais/mL, sendo inoculados 0,1mL desta suspensão por animal, via subcutânea no dorso de cada animal.

### 3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Com o objetivo de se determinar a viabilidade celular a um volume de suspensão de células, foi acrescido um volume de Azul de Trypan na concentração de 2% (0,8mL da suspensão celular para 0,2mL de azul Trypan). Posteriormente, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula, e procedemos à contagem percentual das células, consideramos vivas aquelas que excluíram o corante, e mortas as que incorporaram o corante Azul de Trypan. Neste protocolo foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

### 3.5 TRATAMENTO COM MELATONINA

O grupo controle foi tratado com 0,1ml de solução fisiológica, via oral, 1x/dia e o grupo teste com 10mg/kg de melatonina importada, via oral, 1x/dia. A melatonina foi diluída em solução fisiológica para aplicação.

### 3.6 EUTANÁSIA

Decorridos vinte e um dias de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de eutanásia com isoflurano. Este procedimento promove o mínimo de estresse e dor nos animais, sendo recomendado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação animal (CONCEA).

### 3.7 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL

Nos estudos morfométricos foram realizados Cortes histológicos corados pela HE e foto micrografados (foto microscópio Nikon, modelo Eclipse 801; com captura de imagem por uma câmera de alta resolução). As imagens capturadas foram analisadas através do software ImagePro-Plus, versão 5.1 (Media Cybernetics).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o teste de normalidade para verificar se as variáveis estavam normalmente distribuídas. Posteriormente, o teste de hipótese de Student indicado para testar uma variável entre dois grupos distintos (Soro Fisiológico e Melatonina) no modo pareado e de médias independentes. No estudo estatístico observamos um nível de significância  $p < 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

O primeiro parâmetro avaliado neste estudo foi a área total do tumor sólido de Ehrlich. Suas dimensões compreendem o conjunto formado por parênquima, área central de necrose e um estroma que a circunda mais externamente. A área total não foi quantitativamente afetada pelo tratamento com melatonina, contrariando a hipótese inicial que norteou o desenvolvimento deste estudo. Como demonstrado na Tabela 1 e Figura 1, não constatamos diferença significativa com relação à área total do tumor entre os grupos controle ou teste.

Tabela 1 - Área total do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina

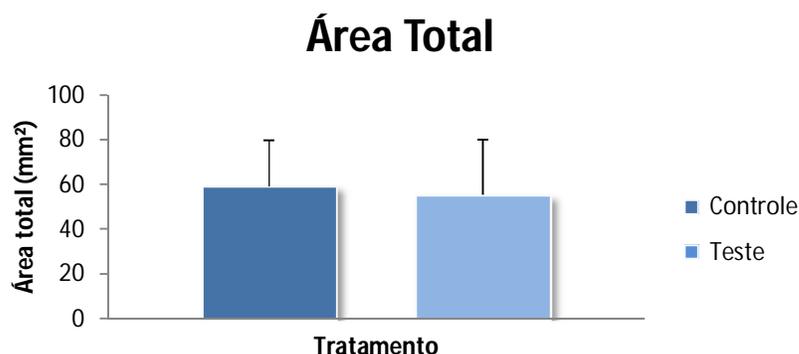
TRATAMENTOS <sup>a</sup>	ÁREA TOTAL (mm <sup>2</sup> )
<i>controle</i> <sup>c</sup>	59,27 ± 17,66 <sup>b</sup>
<i>teste</i> <sup>d</sup>	52,60 ± 17,84

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota:

- Animais foram tratados por um período total de vinte e um dias, com solução fisiológica, via oral, 0,1mL, 1x/dia ou com melatonina 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia.
- Resultados expressos em média ± desvio padrão;
- N= 10 animais;
- N= 7 animais, três dos animais do grupo teste ficaram inviáveis pois o tumor se expandiu via intraperitoneal.

Figura 1 - Área total do tumor sólido de Ehrlich



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Os resultados expressam a média +/- desvio-padrão da área total da lesão (em mm<sup>2</sup>)

Ao analisarmos o parênquima tumoral, constituído de células tumorais vivas e com proliferação constante, observamos com facilidade figuras de mitose, células atípicas e anaplásicas, porém não houve reflexo nas dimensões deste parâmetro o tratamento com melatonina. Esses resultados se encontram demonstrados na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2 - Área de parênquima do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina

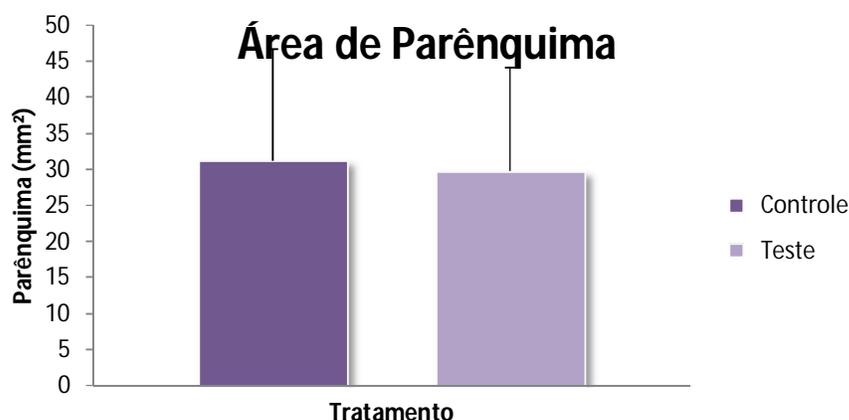
TRATAMENTOS <sup>a</sup>	ÁREA PARÊNQUIMA (mm <sup>2</sup> )
<i>controle</i> <sup>c</sup>	31,10 ± 15,56 <sup>b</sup>
<i>teste</i> <sup>d</sup>	29,70 ± 14,41

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota:

- Animais foram tratados por um período total de vinte e um dias, com solução fisiológica, via oral, 0,1mL, 1x/dia ou com melatonina 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia;
- Resultados expressos em média ± desvio padrão;
- N= 10 animais;
- N= 7 animais. três dos animais do grupo teste ficaram inviáveis pois o tumor se expandiu via intraperitoneal.

Figura 2 - Parênquima tumoral



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Os resultados expressam a média +/- desvio padrão da área de parênquima da lesão ( em mm<sup>2</sup>).

O terceiro parâmetro analisado foi a área central de necrose. Corroborando os achados anteriores não observamos qualquer diferença entre os grupos avaliados, pois a não constatação de diferenças significativas tanto na área total quanto no parênquima, como consequência lógica, resultaria em dimensões semelhantes das áreas de necrose. Demonstramos estes dados na Tabela 3 e Figura 3.

Tabela 3 - Área de necrose do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina

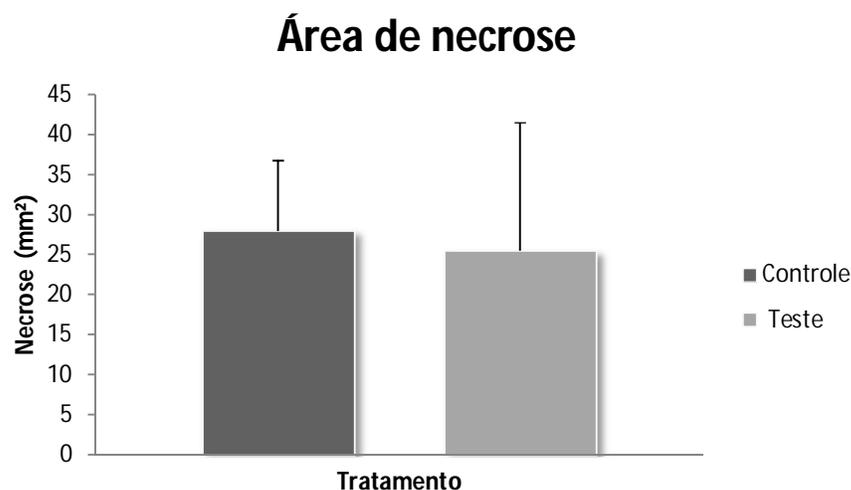
TRATAMENTOS <sup>a</sup>	ÁREA NECROSE (mm <sup>2</sup> )
<i>controle</i> <sup>c</sup>	27,98 ± 8,76 <sup>b</sup>
<i>teste</i> <sup>d</sup>	25,49 ± 15,48

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota:

- Animais foram tratados por um período total de vinte e um dias, com solução fisiológica, via oral, 0,1mL, 1x/dia ou com melatonina 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia;
- Resultados expressos em média ± desvio padrão;
- N= 10 animais;
- N= 7 animais. três dos animais do grupo teste ficaram inviáveis pois o tumor se expandiu via intraperitoneal.

Figura 3 - Área de necrose

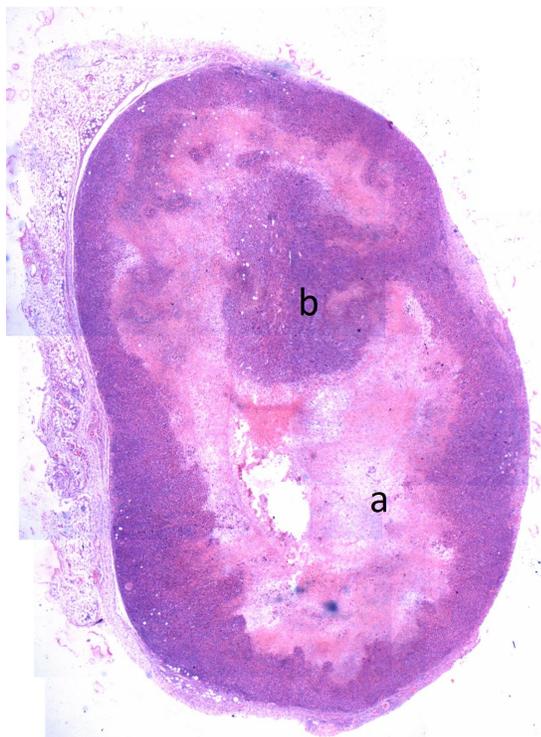


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Os resultados expressam a média +/- desvio padrão da área de necrose da lesão ( em mm<sup>2</sup>).

Na Figura abaixo, está demonstrado à composição do tumor solido de Ehrlich.

Figura 4 - tumor de Ehrlich



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: a: área de necrose b: área de parênquima;  
coloração H.E, aumento 20x

## 5 DISCUSSÃO

Os tumores sólidos constituem a forma de crescimento tumoral mais comum na espécie humana. São constituídos por porções distintas em seu conteúdo celular. O estroma tumoral é a porção mais externa onde são encontrados vasos neoformados e fibroblastos, sendo este o responsável pela sustentação e nutrição da massa neoplásica. Mais internamente encontramos o parênquima composto por células tumorais viáveis em crescimento regular ou acentuado dependendo da fase em que se encontra o tumor. A porção mais central é formada por áreas de necrose, onde se encontram células tumorais que sofreram necrose por coagulação em função da baixa oxigenação desta região.

Neste estudo não constatamos diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com melatonina. Com base neste resultado podemos levantar a questão de que a análise da área total não é um parâmetro fiel, pois reflete todas as porções que constituem o tumor, sendo assim a análise do parênquima e das áreas de necrose se tornam indispensáveis.

O parênquima tumoral não foi significativamente reduzido pelo tratamento com melatonina, o que discorda estudos anteriores com outros modelos (BLASK, 2009; SANTOS; CONSTANTINO, 2015).

O mecanismo de ação da melatonina, com base em nosso estudo, tem ação direta sobre a célula tumoral. Esta ação direta pode envolver mecanismos distintos que não foram objeto de estudo neste momento, entretanto há uma associação bem visível entre os níveis de estresse e a evolução do tumor, esta ação pode colidir em um desequilíbrio hormonal resultando em resposta imunitária deficiente. A ação da melatonina pode ter efeito tumoricida ou a capacidade de interferir na proliferação das células neoplásicas. (BLASK, 2009; FUCHS et al., 2010;).

A comparação das médias das áreas de necrose não revelou diferença significativa. Porém, percentualmente podemos levantar a questão de que estas áreas assumiram maiores proporções no grupo tratado com melatonina. Estudos adicionais neste modelo empregando maior número de indivíduos por grupo pode esclarecer tal fato.

Como neste estudo foram utilizados animais de linhagem não isogênica, era esperado um desvio padrão significativo, porém os resultados obtidos revelaram um

desvio superior. Podemos então sugerir que estes dados precisam ser avaliados em estudo futuro empregando um número maior de animais por grupo o que poderia confirmar ou contrapor os resultados aqui demonstrados. Em função do elevado desvio também foi realizada uma análise estatística empregando o teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando medianas, mas por esta análise também não foi constatada diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados.

## 6 CONCLUSÕES

- a) o tratamento com melatonina, no período de avaliação utilizado neste estudo não afetou as áreas totais, de parênquima ou de necrose no tumor sólido de Ehrlich;
- b) o número de animais por grupo pode ter influenciado nossos resultados pois diferem dos estudos publicados anteriormente;
- c) estudos adicionais, ampliando o número de animais e avaliando outros momentos do desenvolvimento do TE são necessários.

## REFERÊNCIAS

- ARENDDT, J. **Melatonin and the Mammalian Pineal Gland**. 1.ed. Guildford: CHAPMAN & HALL, 1995
- BLASK, D. E. Melatonin, Sleep Disturbance and Cancer Risk. **Sleep Medicine Reviews**, London, v. 13, n. 4, p. 257-264, Aug. 2009. Disponível em: <<http://migre.me/skMWe>>. Acesso em: 14 jul. 2014.
- COS, S. et al. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of mcf-7 human breast cancer cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, p. 4383-4390, Oct. 1998. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/19/4383.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 ago. 2014.
- D'AGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 97-103, 1992. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/51958/56008>>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- FERREIRA, C. da S. et al. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 6, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v56n6/v56n6a24.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- FRANCO, M. et al. **Patologia: processos gerais**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- FUCHS, L. F. P. et al. Ação da melatonina sobre a apoptose e fator de crescimento endotelial vascular no córtex da adrenal de ratas pinealectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 8, p. 374-380, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v32n8/a03v32n8.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- LISSONI, P. et al. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. **Neuro endocrinology letters**, Weinheim, v. 22, n. 1, p. 45-47, 2001. Disponível em: <[http://www.nel.edu/22\\_1/NEL220101A05\\_Lissoni\\_.pdf](http://www.nel.edu/22_1/NEL220101A05_Lissoni_.pdf)>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- MANTOVANI, G. et al. Managing cancer-related anorexia/cachexia. **Drugs**, Auckland, v. 61, n. 4, p. 499-514, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200161040-00004>>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- OLIVEIRA, C. M. B. de et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 255-265, mar./abr. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rba/v61n2/v61n2a14.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2015.
- REIS, O. T. G. et al. Effect of L-Arginine and L-NAME treatments on polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells in flux during tumor growth. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 107-111, Mar./Apr. 2009.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v24n2/06.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

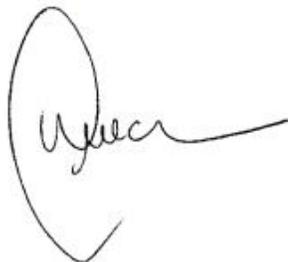
SANTOS, D. M. dos; CONSTANTINO, D. H. J. Efeito do tratamento com melatonina sobre a produção de metástases neoplásicas. **SALUSVITA**, Bauru, v. 34, n. 1, p. 71-86, 2015. Disponível em: <[http://www.usc.br/biblioteca/salusvita/salusvita\\_v34\\_n1\\_2015\\_art\\_05.pdf](http://www.usc.br/biblioteca/salusvita/salusvita_v34_n1_2015_art_05.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2015.

**ANEXO A – Comitê de Ética****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA - USC****CERTIFICADO**

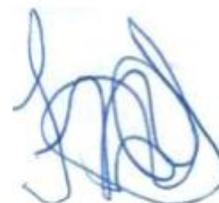
PROTOCOLO Nº 11/14

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA analisou o projeto "INFLUENCIA DA MELATONINA SOBRE A EVOLUÇÃO TUMORAL: Uma análise do envolvimento da fibrose intratumoral.", sob a responsabilidade da pesquisadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Dulce Helena Jardim Constantino e o considerou APROVADO.

Bauru, 13 de Maio de 2014.



Dra. Dulce H. J. Constantino  
*Presidente CEUA - USC*



Francine Souza  
*Secretária CEUA - USC*