

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**MARTA SOLANGE LADEIRA**

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE HIALURONATO NO  
TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH TRATADO COM O  
HORMÔNIO MELATONINA**

**BAURU  
2016**

**MARTA SOLANGE LADEIRA**

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE HIALURONATO NO  
TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH TRATADO COM O  
HORMÔNIO MELATONINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Dulce H. J. Constantino.

BAURU  
2016

Ladeira, Marta Solange

L154a

Avaliação do teor de hialuronato no tumor sólido de ehrlich tratado com o hormônio melatonina / Marta Solange Ladeira. -- 2016.

29f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Tumor de Ehrlich. 2. Melatonina. 3. Hialuronato. I. Constantino, Dulce Helena Jardim. II. Título.

**MARTA SOLANGE LADEIRA**

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE HIALURONATO NO TUMOR SÓLIDO DE  
EHRlich TRATADO COM O HORMÔNIO MELATONINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Dulce H. J. Constantino.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Dulce H. J. Constantino  
Universidade do Sagrado Coração

---

Dra. Caroline M. E. Pompei

Bauru, 30 de Novembro de 2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela oportunidade dada e por vivenciar esse momento.

Aos Professores da Universidade do Sagrado Coração, a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce H. J. Constantino, por toda sua dedicação e paciência durante o curso.

Aos meus pais Terezinha e Lazaro Ladeira pelo carinho e por não me deixar desistir.

A Clínica Veterinária Volpato, por me ceder o tempo necessitado.

Aos meus amigos que me ajudaram nas disciplinas em que me encontrei durante o curso - que me incentivaram com alguma palavra amiga.

Agradeço a técnica Bióloga Maira Couto do laboratório de Histotécnica pela oportunidade e também por me passar seus conhecimentos.

Ao técnico Wilson Orcini do laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, pela ajuda com as análises de imagens.

Ao Comitê de Ética, por avaliar e aprovar a realização desse experimento.

Ao grupo de estudo oncologia experimental (GEONE), pela oportunidade de obter novos conhecimentos.

E a farmacêutica Jessica Sabbatine Chimini que sem sua ajuda não seria possível essa pesquisa.

E por último, agradecer à Universidade do Sagrado Coração, pelo ensino de qualidade durante o período da graduação.

“O homem não é nada além daquilo que a  
educação faz dele.”

Immanuel Kant

## RESUMO

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, e está relacionada com a regulação dos ritmos circadianos, enquanto o hialuronato é uma substância essencial nas atividades celulares, devido a sua capacidade de ligação com algumas proteínas da parede celular e do parênquima. Este trabalho tem como finalidade investigar se o tratamento com melatonina é mesmo capaz de influenciar a produção do hialuronato no estroma do tumor sólido de Ehrlich. A metodologia consistiu no emprego de 20 camundongos Swiss, sendo separados em grupo controle, tratados com 0,1ml solução fisiológica e grupo teste, com 10mg/kg de melatonina, diluída em solução fisiológica para aplicação, sendo que, esses dois grupos foram tratados via oral, 1 vez ao dia e inoculados com  $10^7$  células tumorais de Ehrlich por via subcutânea no dorso dos animais. Transcorridos 21 dias, os animais foram eutanasiados com dose letal de Thiopental (150mg/kg de peso animal) e Lidocaína (10mg/mL). Retirada a massa tumoral, foi seccionada longitudinalmente, e uma parte foi fixada e emblocada em parafina histológica e corada pelo método de HE para avaliação histotécnica, outra secção só tecido emblocado foi corada pelo método do Azul de Toluidina para quantificação do hialuronato. Para análise da distribuição dos resultados obtidos foi empregado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para posteriormente ser utilizado o teste T de *student*, para a avaliação do nível de significância,  $p < 0,05$ . Os resultados apresentaram uma ação significativa da melatonina no tumor de Ehrlich, onde foi possível observar redução na área total do tumor e que este efeito foi associado a um aumento na produção do hialuronato no estroma tumoral.

**Palavras- chave:** Tumor de Ehrlich. Melatonina. Hialuronato.

## ABSTRACT

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland, and is related to the regulation of circadian rhythms, whereas hyaluronate is an essential substance in cellular activities, due to its ability to bind to some proteins of the cell wall and parenchyma. This work aims to investigate if the treatment with melatonin is even able to influence the production of hyaluronate in the stroma of the solid tumor of Ehrlich. The methodology consisted of the use of 20 Swiss mice, being separated in a control group, treated with 0.1 ml physiological solution and test group, with 10 mg / kg of melatonin, diluted in physiological solution for application, and these two groups were treated via Oral, once daily and inoculated with  $10^7$  Ehrlich tumor cells subcutaneously on the backs of the animals. After 21 days, the animals were euthanized with a lethal dose of Thiopental (150mg / kg animal weight) and Lidocaine (10mg / mL). Removal of the tumor mass was sectioned longitudinally, and one part was fixed and embedded in histological paraffin and stained by the HE method for histomorphometric evaluation, another section alone tissue was stained by the Toluidine Blue method for quantification of hyaluronate. For the analysis of the distribution of the obtained results, the Shapiro-Wilk normality test was used, later the Student's T test was used to evaluate the level of significance,  $p < 0.05$ . The results showed a significant action of melatonin on the Ehrlich tumor, where it was possible to observe reduction in the total tumor area and that this effect was associated with an increase in hyaluronate production in the tumor stroma.

**Keywords:** Tumor of Ehrlich. Melatonin. Hyaluronate

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	14
3.2	ANIMAIS .....	14
3.3	NEOPLASIA .....	15
3.4	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....	15
3.5	TRATAMENTO COM MELATONINA .....	15
3.6	EUTANÁSIA .....	15
3.7	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL.....	16
3.7.1	<b>Estudo morfométrico</b> .....	16
3.7.2	<b>Tratamento com azul de toluidina acético</b> .....	16
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>27</b>
	<b>ANEXO A – Comitê de ética</b> .....	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento neoplásico maligno, popularmente denominado “câncer”, é resultado de mutações acumuladas nos genes essenciais ao controle da fisiologia celular. As funções de proliferação, diferenciação, morte celular por apoptose e estabilidade do genoma, são ativadas ou inativadas pelas alterações sofridas pelo DNA consequentes à agressão ao genoma das células. Esse processo é denominado carcinogênese ou oncogênese, e é dinâmico, evoluindo em múltiplas etapas. Resultam, daí estruturas celulares que evoluirão até a formação de um tumor que pode destruir o organismo do hospedeiro. (MONTENEGRO; FRANCO, 2010).

É importante frisar que alguns tipos de cânceres são hereditários, enquanto outros podem se desenvolver ao longo da vida, devido a uma mutação em células somáticas. O desenvolvimento das neoplasias pode ocorrer devido a mutações, onde ocorre a multiplicação das células desenfreadamente e mutações nos genes supressores tumorais, que os inativam. (GRIFFITHS et al., 2009). As causas do câncer podem ser internas (hereditariedade, familiar, étnico por exemplo), e externas (tabagismo, exposição exagerada ao sol, radioatividade, entre outros). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Neoplasias malignas possuem como característica o fato de conseguir se evadir da resposta imunitária do hospedeiro facilitando seu desenvolvimento e manutenção. A resposta imunitária capaz de controlar o crescimento tumoral é uma resposta adaptativa celular, com importante participação de macrófagos e linfócitos natural killers (NK). (MACHADO et al., 2004).

O prognóstico ruim associado a uma neoplasia está condicionado à presença de metástases distantes do tumor primário. Metástase é um tumor secundário, que cresce separadamente do tumor primário. Ele se origina de células que se destacaram do tumor primário, e foram transportadas para outros locais. O transporte pode se fazer através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, ou ainda pelos fluidos existentes nas cavidades naturais. Pode acontecer também invasão por contiguidade, quando o tumor primário cresce e compromete estruturas anexas, como, por exemplo, o câncer do útero alcança bexiga, vagina, reto, músculos e ossos, mas também caindo na circulação hemática ou linfática. (MONTENEGRO; FRANCO, 2010).

Para produzir uma metástase, as células tumorais deverão se separar das

suas congêneres (perda da coesão), movimentar-se na direção correta (quimiotaxia), e digerir a matriz extracelular e a membrana basal dos vasos (enzimas). Uma vez na luz do vaso, deverão escapar dos múltiplos sistemas de defesa, tais como anticorpos, complemento, macrófagos, linfócitos, células NK, etc. As células tumorais, sendo pouco deformáveis, sobrevivem aos inúmeros traumatismos oriundos da circulação, até ocluírem, por embolia, pequenos vasos a jusante do ponto de inoculação. Nesse novo local, deverão ser capazes de aderir ao endotélio (adesinas), lesar a membrana basal e, ainda no interstício, resistir à agressão dos macrófagos e outras células locais. Deverão ainda se multiplicar e estimular a angiogênese, para poder crescer às custas da neovascularização. (MONTENEGRO; FRANCO, 2010).

A angiogênese nada mais é do que um processo de múltiplos degraus que conduz à formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes e que participa em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o crescimento tumoral e de metástases. (GONZÁLEZ et al., 2000). A formação e manutenção tumoral é condicionada por uma nutrição constante, que só poderá vir através de vasos sanguíneos que o sustentem. Para isso, usa os próprios capilares regionais, formando a partir de seu endotélio, por brotação, novos vasos, que cuidarão do transporte dos nutrientes ao tumor, bem como dos vasos venosos, que levarão o resíduo dessa alimentação de volta para o sistema circulatório regional. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). No crescimento tumoral o câncer já pré-existente se multiplica alimentando-se dos vasos sanguíneos que o cercam para seu crescimento, já na metástase o câncer por estímulos químicos (quimiotaxia) segue para dentro do vaso e, por embolia entope o capilar e utiliza-se do vaso para alimentação e fixação em outra parte do corpo. (ARAÚJO et al., 2005).

Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma enzima que estimula o crescimento de vasos sanguíneos para restaurar o aporte de oxigênio de tecidos quando a circulação do sangue é insuficiente. A função do VEGF, que aparece ligado a heparina, é de formação de novos vasos já desde seu desenvolvimento embrionário para restaurar tecido lesionado. O câncer pode expressar essa enzima para a formação de neovasos em seu redor para sua nutrição e das metástases. Fator de crescimento endotelial é um dos principais agentes já que assegura várias funções como: mitogêneses de fibroblastos, de células epiteliais e de células endoteliais, promotor da malignização e da migração celular epitelial, antiapoptótico, e pró-angiogênico de várias neoplasias, entre as quais o tumor de mama, do pulmão, o

glioblastoma, da cabeça e do pescoço, do cólon, de bexiga e da próstata. (MONTENEGRO; FRANCO et al., 2010). Um dos alvos terapêuticos empregados na contenção do crescimento tumoral é a inibição da angiogênese, afetando secundariamente a nutrição e como consequência o crescimento neoplásico. (PINHO, 2005).

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, cuja secreção está diretamente relacionada ao ciclo claro/escuro. É um poderoso antioxidante e tem papel fundamental na regulação do estado sono/vigília, do ritmo de vários processos fisiológicos, participando do controle do relógio biológico, inclusive nos seres humanos. Ressalta-se que há evidências da sua ação no sistema genital feminino, influenciando a função ovariana e a fertilidade. De fato, este hormônio interage com esteróides sexuais, como o estrogênio, modificando a sinalização celular e a resposta no tecido alvo. (MAGANHIN et al., 2008).

O hormônio do sono (melatonina) funciona após fecharmos os olhos já que recebem respostas de células fotossensíveis dos olhos, seu efeito é o inverso do cortisol, hormônio da atividade, o qual está envolvido nas respostas inflamatórias, no metabolismo da glicose e nas respostas imunes. Também chamado hormônio do estresse ele está envolvido na área da preocupação e na não resolução dos problemas, quando o cortisol aumenta deliberadamente pode causar várias alterações no organismo, como insônia, desequilíbrio nos níveis glicêmicos e cicatrização lenta. Com relação às neoplasias, pode atuar como um catalisador, podendo aumentar o volume tumoral, também podendo acontecer o contrário, no aumento da melatonina, pode haver uma diminuição do câncer. (JUNG; AHMAD, 2006).

A melatonina não é mais vista apenas por sua interferência nos ritmos circadianos, na reprodução sazonal dos roedores, entre outras finalidades. A partir da última década, o que tem mais chamado à atenção dos pesquisadores tem sido sua função na diminuição da neoformação vascular provocada pela melatonina, o aporte de sangue ao tumor diminui, o que leva à diminuição de seu suprimento de oxigênio, e conseqüentemente, à redução de seu tamanho. (TOLEDO, 2013).

O tumor de Ehrlich maligno é de origem epitelial, e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos. É transplantável, usado experimentalmente, e quando implantado via subcutânea, cresce na forma sólida. (VERÇOSA JUNIOR et al., 2007).

Estudos anteriores do nosso grupo de trabalho (dados ainda não publicados), apontam para a capacidade do hormônio melatonina de redução do crescimento tumoral e da produção de metástases linfáticas do tumor sólido de Ehrlich, porém há necessidade de esclarecer os mecanismos envolvidos nestes eventos.

Em vista do exposto, este estudo pretende esclarecer se o tratamento com melatonina é capaz de influenciar a produção do hialuronato no estroma tumoral, elucidando o mecanismo de ação antitumoral já observado anteriormente.

Acredita-se ser o hialuronato é uma substância essencial as atividades celulares, como por exemplo, remodelação de tecidos, inflamação, e tumorigênese entre outras. Além das proteínas do estroma que se associam ao hialuronato, sabe-se que existem proteínas da parede celular que podem ligar-se e responder diretamente aos hialuronatos. As proteínas CD44 e RHAMM atuam também na migração celular, ativação de linfócitos, e na progressão do tumor. Muitos desses processos dependem de uma associação com hialuronato. (SHERMAN et al., 1994). O hialuronato é um polissacarídeo não tóxico, biodegradável, biocompatível, que tem sido muito investigado como alvo específico de entrega de drogas em vários receptores do corpo, especialmente no fígado onde são abundantemente expressos receptores HA para endocitose (HARE) e CD44. (KIM et al, 2016).

Dentre as citocinas existe um grupo, os Fatores de Necrose Tumoral (TNFs) responsável por indução da apoptose das células tumorais, cicatrização das feridas cutâneas, além de outras atividades pró-inflamatórias. São produzidos principalmente por macrófagos ativados, além de neutrófilos que migraram para o sítio da inflamação. (RITSU et al., 2016).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este estudo teve como objetivo principal estudar a correlação entre a quantidade de hialuronato presente no estroma do tumor sólido de Ehrlich em animais tratados com melatonina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos são:

- Quantificar o crescimento tumoral e o hialuronato;
- Estabelecer a relação entre hialuronato e o tratamento com melatonina.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Encontra-se descrito os materiais utilizados e os métodos empregados com os animais, assim como a realização de técnicas de histotécnica com o intuito de atingir os objetivos do presente trabalho.

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram empregados 20 camundongos Swiss, distribuídos em dois grupos: Um grupo controle, contendo dez animais tratados com 0,1ml de solução fisiológica, via oral, 1x/dia, e o grupo teste contendo dez animais tratados com 10mg/kg de melatonina (SIGMA), via oral, 1x/dia. Todos os animais foram inoculados com  $10^7$  células tumorais por via subcutânea. Decorridos vinte e um dias os animais foram eutanasiados com dose letal de Thiopental (150mg/kg de peso animal) e Lidocaína (10mg/mL).

A massa tumoral foi removida e seccionada ao longo do seu maior eixo. Uma parte foi fixada e encaminhada para processamento e coloração pela HE. Fragmentos emblocados em parafina histológica foram processados para avaliação, por histotécnica de hialuronato. Foi realizada a análise morfométrica do tecido tumoral corado pela HE. Este protocolo foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Sagrado Coração.

#### 3.2 ANIMAIS

Para realização do presente estudo foram utilizados vinte camundongos Swiss, machos, com 60 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 fluido ascítico foi retirado, por punção da cavidade peritoneal, e a suspensão foi 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 a 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

Os animais foram distribuídos em dois grupos: um grupo controle contendo dez animais tratados com 0,1ml de solução fisiológica, via oral, 1x/dia e o grupo teste contendo dez animais tratados com 10mg/kg de melatonina (SIGMA), 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 com dose letal de Thiopental (150mg/kg de peso animal) e Lidocaína (10mg/mL). Este protocolo foi submetido e avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade do Sagrado Coração.

### 3.7 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL

A avaliação do crescimento tumoral consiste em:

#### 3.7.1 Estudo morfométrico

Cortes histológicos corados pela HE foram fotomicrografados (fotomicroscópio 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).

#### 3.7.2 Tratamento com azul de toluidina acético

Para coloração da parte histológica, foi empregado azul de toluidina em 0,2g por um mililitro de ácido acético em diluição a ser ajustada com 99 mililitros de água destilada. Corou por 3 minutos. O resultado corou os núcleos de azul, a metacromasia, granulações de mastócitos e mucopolissacarídeos de vermelho rubro.

### 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 no modo pareado e de médias independentes. No estudo estatístico observaremos um nível de significância  $p < 0,05$ .

Neste estudo foi empregado inicialmente o teste de normalidade Shapiro-Wilk, no sentido de avaliar a distribuição dos resultados obtidos. Posteriormente foi utilizado o teste paramétrico de T de *student* para avaliação da variável de estudo "tratamento". O estudo estatístico foi realizado com auxílio do software Sigma Stat versão 3.1, Jandel Scientific.

#### 4 RESULTADOS

As tabelas e gráficos abaixo mostram os resultados do estudo do efeito do tratamento com melatonina sobre o tumor sólido de Ehrlich, analisados estatisticamente, após coloração com HE e azul de toluidina. Como se observa na Tabela 1 e na Figura 1, os tratamentos realizados no presente estudo evidenciam significativa ação da melatonina sobre o tumor de Ehrlich utilizando o método de HE, a partir da redução da área tumoral. Com efeito, em termos médios, observou-se uma redução de um valor médio de 21,75 mm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle, devido à conhecida redução da angiogênese provocada pela ação da melatonina.

Tabela 1. Efeitos dos tratamentos com melatonina ou solução fisiológica sobre a área total do tumor sólido de Ehrlich (coloração HE).

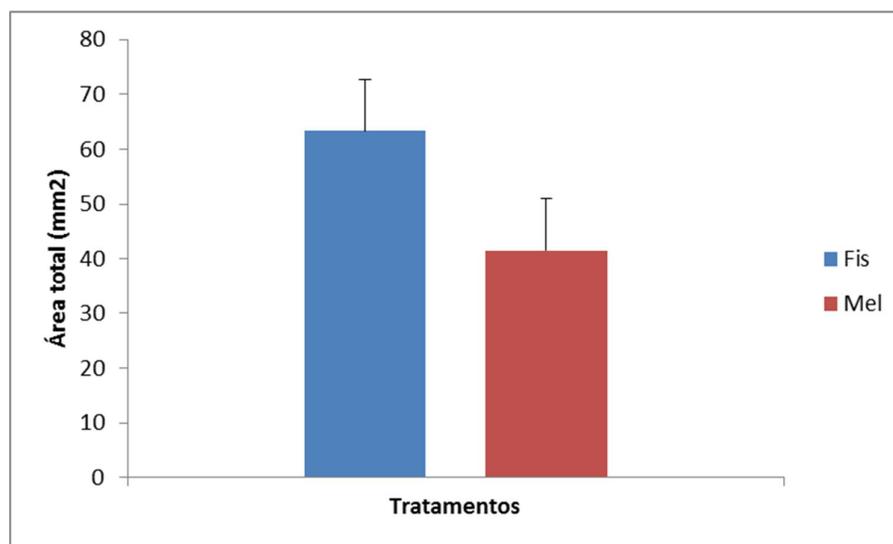
TRATAMENTO/PERÍODO	ÁREA – mm <sup>2</sup>
<b>FIS VO – 21 DIAS</b>	<b>63,37 ± 9,41</b>
<b>MEL VO – 21 DIAS</b>	<b>41,62 ± 9,33*</b>

Legenda: a. FIS - solução fisiológica; MEL- melatonina; VO- via oral; b. Resultados expressos em média±desvio padrão; c. \* - p<0,05 – na comparação com o grupo FIS VO 21dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

O Gráfico 1 foi construído com embasamento dos dados colhidos e registrados na Tabela 1, onde é mostrado o total de dias em que o experimento vigorou, com a administração oral da solução fisiológica e do hormônio melatonina nos camundongos, para depois ser calculado a média e o desvio-padrão do grupo controle (FIS) e grupo teste (MEL).

Figura 1. Gráfico com a área total do tumor sólido de Ehrlich, coloração HE.



Fonte: Elaborada pela autora.

Semelhantemente, como se observa na Tabela 2 e na Figura 2, houve um resultado estatisticamente significativo de redução da área da secção do tumor sólido de Ehrlich, pelo tratamento com melatonina, mediante avaliação pela coloração de Azul de Toluidina. Novamente foi encontrada uma redução, em termos médios, de 5,59mm<sup>2</sup>.

Tabela 2. Efeitos dos tratamentos com melatonina ou solução fisiológica sobre a área corada pelo método Azul de Toluidina no tumor sólido de Ehrlich.

<b>ÁREA – mm<sup>2</sup></b>	
<b>TRATAMENTO/PERÍODO</b>	
<b>FIS VO – 21 DIAS</b>	<b>14,64 ± 4,23</b>
<b>MEL VO – 21 DIAS</b>	<b>9,05 ± 2,66*</b>

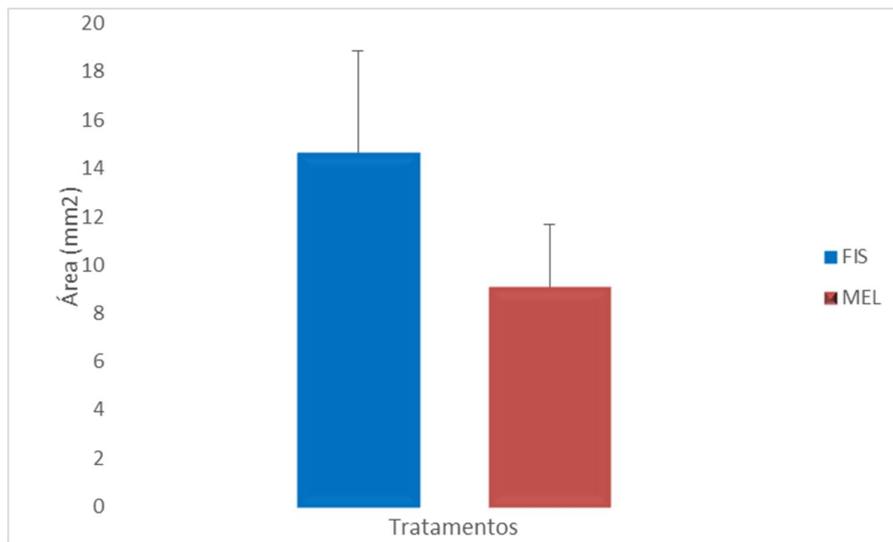
Legenda: a. FIS - solução fisiológica; MEL- melatonina; VO- via oral; b. Resultados expressos em média±desvio padrão; c. \* - p<0,05 – na comparação com o grupo FIS VO 21dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

O Gráfico 2 também foi criado com base nos dados colhidos na Tabela 2, onde foi exposto os dias totais em que a metodologia vigorou, sendo 21 dias com administração de solução fisiológica no grupo controle e 21 dias de aplicação da melatonina nos camundongos do grupo teste, por via oral. Para então determinar à

média e o desvio-padrão desses tratamentos.

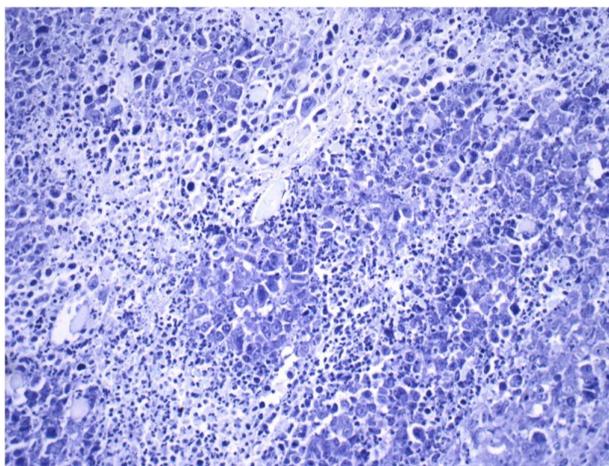
Figura 2. Gráfico com ação da melatonina na coloração pelo método do Azul de Toluidina no Tumor sólido de Ehrlich.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 3 apresenta células tumorais necróticas e células viáveis, no tumor de Ehrlich, por morfometria de tecido corado pela azul de toluidina.

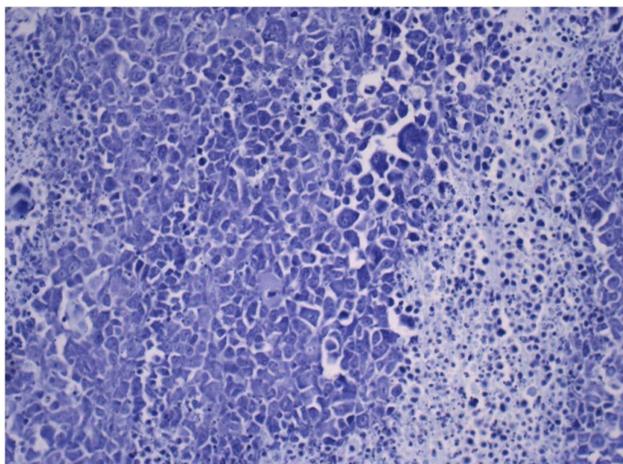
Figura 3: Tumor de Ehrlich do grupo controle. Fotomicrografia (200x).



Fonte: Elaborada pela autora

Na Figura 4 também foram observadas células necróticas tumorais e células viáveis, através da técnica de morfometria em tecido corado pela azul de toluidina.

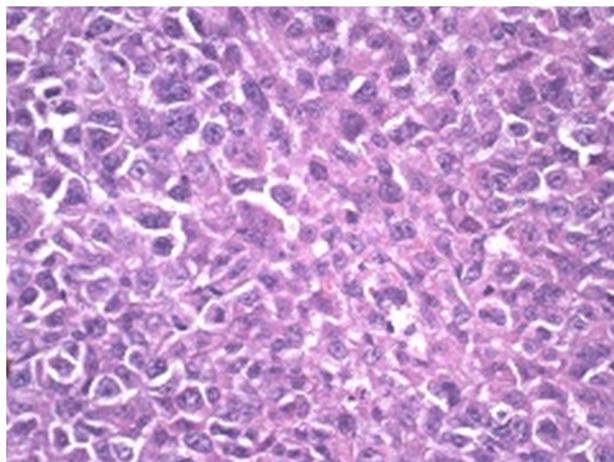
Figura 4: Tumor de Ehrlich do grupo teste.  
Fotomicrografia (200x).



Fonte: Elaborada pela autora

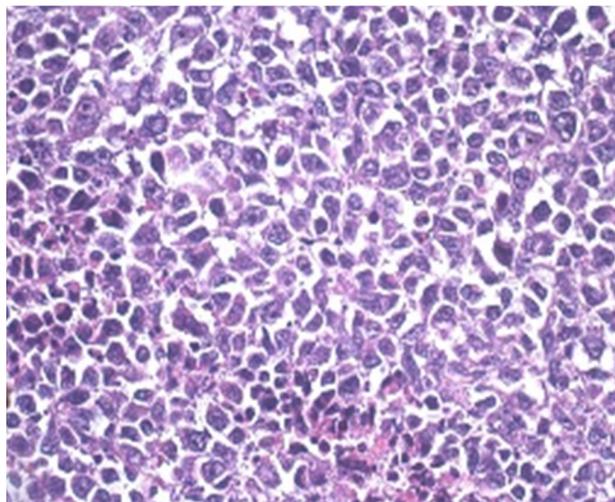
De fato houve, de acordo com o observado na Figura 4, por ação do hormônio da melatonina, um aumento na produção de hialuronato no parênquima dos tumores sólidos de Ehrlich, resultando em redução do tamanho dos mesmos, conforme se observa na Figura 3.

Figura 5: Parênquima grupo controle, corado com HE. Aumento 400x.



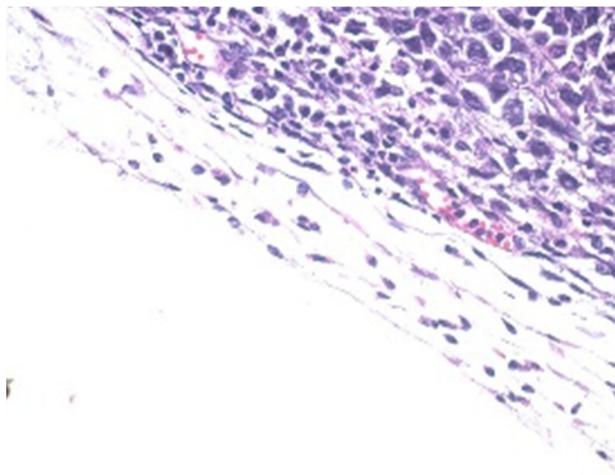
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 6: Parênquima grupo melatonina, corado com HE. Aumento 400x.



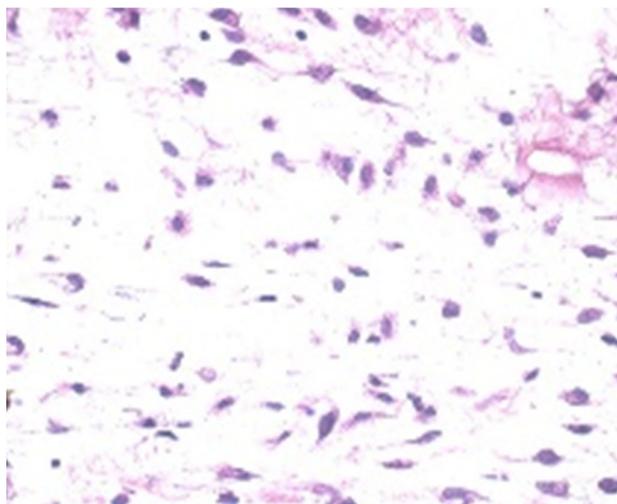
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 7: Estroma grupo controle, corado com HE. Aumento 400x.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 8: Estroma grupo melatonina, corado com HE . Aumento 400x.



Fonte: Elaborada pela autora

## 5 DISCUSSÃO

Os tecidos se apresentavam incolores, na maioria dos cortes histológicos, por isso, foram desenvolvidas algumas técnicas de coloração, para evidenciar e distinguir os tecidos estudados. Uma grande parte dos corantes se comporta como ácidos ou bases para assim formar ligações eletrostáticas com os radicais ionizados dos tecidos. São denominados basófilos, os tecidos que se coram com corantes básicos, enquanto que acidófilos, se coram por corantes ácidos. Tanto o azul de toluidina como a hematoxilina é tido como um corante básico, pois se ligam às estruturas basófilas dos tecidos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os tecidos que interagem com os corantes básicos, ionizam e coram por conter ácidos na sua composição, como ácidos nucleicos, glicosaminoglicanas e glicoproteínas ácidas. Os corantes ácidos coram as estruturas acidófilas dos tecidos, como por exemplo, mitocôndrias, grânulos de secreção, proteínas citoplasmáticas e colágeno. O corante mais utilizado é a combinação de hematoxilina e eosina, formando o conhecido HE. Sendo que a hematoxilina é responsável por corar (azul ou violeta), o núcleo das células e outras estruturas ácidas, enquanto a eosina cora (rosa), o citoplasma e o colágeno. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A terapia do câncer tem sido um desafio ao longo de muitas décadas. Toda observação científica que oriente a uma progressão favorável nessa autêntica guerra de vida ou morte, será sempre bem vinda.

Fatores como estresse e depressão têm sido relacionados como co-adjuvantes juntamente com derivados da inflamação crônica, como teor alto de substâncias oxigênio-reativas, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e proteases, no crescimento de certos tumores. Além disso, estresse e depressão diminuem a atividade das células T citotóxicas bem como das *natural killers*, o que afetaria as defesas naturais contra tumores, além de facilitar o surgimento destes por mutações somáticas e instabilidade genômica (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2005).

Estudando tumores, com o objetivo de tratá-los, a Medicina progrediu desde o simples procedimento cirúrgico, para técnicas já amplamente conhecidas, como a quimioterapia e a radioterapia. No entanto, com muita probabilidade, existem métodos de tratamento que poderiam vir a ajudar ou isoladamente, ou associados a essas técnicas. Com este enfoque, pesquisadores têm percebido a atuação da

melatonina na redução do tamanho de tumores.

A melatonina age como um agente antioxidante e pode eliminar radicais livres em altas concentrações bem como ativando enzimas antioxidantes em baixas concentrações. Além disso, há evidências de que o surgimento de efeitos colaterais é mínimo, mesmo a longo prazo. Além disso, o indol tem se mostrado eficiente na prevenção dos efeitos degenerativos consequentes ao envelhecimento, incluindo a incidência de tumores malignos. (MAGANHIN et al., 2008).

Em experimentos feitos no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), sob a coordenação da professora Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari, a melatonina foi capaz de reduzir pela metade, em média, o crescimento do tumor em camundongos, através de dois modelos, *in vitro*, de câncer de mama. Os dados que demonstram a eficiência da melatonina em inibir o crescimento de tumores, segundo os quais, animais tratados com hormônio apresentam aproximadamente a metade do volume dos tumores de animais de grupo controle, em um período de 21 dias, com relato inclusive de redução drástica do volume em um dos casos (TOLEDO, 2013).

Pereira (2013) demonstrou que a melatonina age reduzindo o volume de tumores estrógeno-dependentes em fêmeas de camundongos Swiss (*Mus musculus*), mesmo durante vigência de tratamento estrogênico. Foram divididos em lotes, submetidos ao ciclo/escuro (12/12 h) e tratados com estrogênio e melatonina. O experimento todo durou 72 dias.

A ação anti-neoplásica da melatonina já foi demonstrada anteriormente, tanto afetando os fatores de crescimento das células tumorais, como facilitando a apoptose dessas células, provocando também diminuição da vascularização tumoral; da mesma forma foi demonstrada sua ação antimetastática (BLASK, 2009).

O ácido hialurônico foi detectado em altos níveis de concentração, no estroma da membrana amniótica. Dados demonstram que a interação ácido hialurônico/linfócitos CD44, desenvolve importante papel na adesão de células inflamatórias, incluindo os linfócitos ao estroma da membrana amniótica. Embora sejam necessários estudos posteriores para decifrar os eventos moleculares envolvidos, a captura de células inflamatória pode explicar alguns dos efeitos clínicos observados no uso da membrana amniótica na reconstrução da superfície ocular (MUNTIMADUGU et al., 2016).

Diante dos resultados que obtivemos neste trabalho, concordamos com a

ação reguladora da melatonina sobre o crescimento dos tumores sólidos de Ehrlich, deve se através do aumento de hialuronato no estroma tumoral, observando que houve redução significativa no seu volume, tanto na coloração de HE quanto no método azul de toluidina.

## 6 CONCLUSÕES

- a) Na utilização do método HE, foi observado uma significativa redução da área tumoral através da ação da melatonina sobre o tumor sólido de Ehrlich, com uma diminuição de  $21,75 \text{ mm}^2$  em relação ao grupo controle.
- b) No método de azul de toluidina, também foi encontrado uma redução significativa no tumor estudado, com uma média de  $5,59 \text{ mm}^2$ .
- c) A atuação do hormônio melatonina mostrou resultados benéficos, pois ocasionou um aumento na produção de hialuronato no parênquima, reduzindo a extensão do tumor sólido de Ehrlich.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. D. et al. Cell Therapy For The Treatment Of Critical Ischemia Of The Lower Limbs. **J. Vasc. Bras.**, São José do Rio Preto, v. 4, n. 4, p. 57-365, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1677-54492005000400011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-54492005000400011)>. Acesso em: 07 mar. 2016.

BLASK, D. E. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. **Sleep Med Rev.**, London, v. 13, n. 4, p. 257-64, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095474>>. Acesso em: 13 set. 2016.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GONZÁLEZ, R. P. et al. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 3, 2000. Disponível em: <[http://scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502000000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 22 mar. 2016.

JUNG, B.; AHMAD, N. Melatonin in cancer management: progress and promise. **Cancer Res.**, Chicago, v. 66, n. 20, p. 9789-9793, 2006. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/20/9789.long>>. Acesso em: 17 abr. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIM, Y. S.; KONG, W. H.; KIM, H.; HAHN, S. K. Targeted systemic mesenchymal stem cell delivery using hyaluronate - wheat germ agglutinin conjugate. **Biomaterials**, Korea, v. 106, p.217-227, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961216304136>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 47-664, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v79n6/a02v79n6.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2016.

MAGANHIN, C. C. et al. Efeitos Da Melatonina No Sistema Genital Feminino. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v54n3/a22v54n3.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer. 2 ed. **INCA**, 2012. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro\\_abc\\_2ed.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf)>. Acesso em: 03 abr. 2016.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

MUNTIMADUGU, E. et al. CD44 targeted chemotherapy for co-eradication of breast cancer stem cells and cancer cells using polymeric nanoparticles of salinomycin and paclitaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, n. 1, p. 532–546, 2016.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776516302302>>. Acesso em: 10 out. 2016.

PEREIRA, D. D. **Efeito da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos swiss**. 2013. 97f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2013.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Ver. Brás. Coloproct.**,

Joinville. v. 25, n. 4, p. 396-402, 2005. Disponível em:

<[http://www.sbc.org.br/revista/nbr254/P396\\_402.htm](http://www.sbc.org.br/revista/nbr254/P396_402.htm)>. Acesso em: 12 jun. 2016.

REICHE, E. M. V.; NUNES, S. O. V.; MORIMOTO, H.K. Disfunções no Sistema Imune Induzidas pelo Estresse e Depressão: Implicações no Desenvolvimento e Progressão do Câncer. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**. Londrina, v. 1, n. 5, p. 19-28. 2005. Disponível em: <<http://sboc.org.br/revista-sboc/pdfs/5/artigo3.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2016.

RITSU, M. et al. Critical role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the early process of wound healing in skin. **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, 2016.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352241016300263>>. Acesso em: 19 out. 2016.

SHERMAN, L.; SLEEMAN, J.; HERRLICH, P.; PONTA, H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 726-33, 1994. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530464#>>. Acesso em: 03 out. 2016.

TOLEDO, K. Melatonina ajuda a combater o câncer de mama, aponta estudo.

**FAPESP**, 2013. Disponível em:

<[http://agencia.fapesp.br/melatonina\\_ajuda\\_a\\_combater\\_o\\_cancer\\_de\\_mama\\_aponta\\_estudo/17443/](http://agencia.fapesp.br/melatonina_ajuda_a_combater_o_cancer_de_mama_aponta_estudo/17443/)>. Acesso em: 06 jun. 2016.

VERÇOSA JUNIOR, D. et al. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. Belo Horizonte, v.59, n.1, p.150-154, 2007. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352007000100025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000100025)> Acesso em: 13 out. 2016.

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

PROTOCOLO N° 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*