

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**LIVIA BERTOZZO MARCELINO DA SILVA
WILLIAM PEREIRA DA SILVA**

**ENVOLVIMENTO DO HORMÔNIO MELATONINA NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL: AVALIAÇÃO DA
PROVÁVEL RELAÇÃO COM A ENZIMA 5-
LIPOXIGENASE (5-LO)**

Bauru
2016

**LIVIA BERTOZZO MARCELINO DA SILVA
WILLIAM PEREIRA DA SILVA**

**ENVOLVIMENTO DO HORMÔNIO MELATONINA NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL: AVALIAÇÃO DA
PROVÁVEL RELAÇÃO COM A ENZIMA 5-
LIPOXIGENASE (5-LO)**

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 Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Dulce H. J. Constantino.

Bauru
2016

Silva, Livia Bertozzo Marcelino da
S5861e

Envolvimento do hormônio melatonina no desenvolvimento tumoral: avaliação da provável relação com a enzima 5-lipoxigenase (5-lo)s / Livia Bertozzo Marcelino da Silva; William Pereira da Silva. -- 2016.
33f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

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

1. Melatonina. 2. Lipoxigenase. 3. Tumor de Ehrlich. I. Silva, William Pereira da Colielo. II. Constantino, Dulce Helena Jardim. III. Título.

**LIVIA BERTOZZO MARCELINO DA SILVA
WILLIAM PEREIRA DA SILVA**

**ENVOLVIMENTO DO HORMÔNIO MELATONINA NO
DESENVOLVIMENTO TUMORAL: AVALIAÇÃO DA
PROVÁVEL RELAÇÃO COM A ENZIMA 5-
LIPOXIGENASE (5-LO)**

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 Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Dulce H. J. Constantino.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Alexandre Bechara
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 28 de novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer primeiramente a Deus por nos proporcionar saúde e força para superar as dificuldades.

A esta universidade, direção e administração que oportunizaram a janela onde hoje vislumbramos um horizonte superior.

Aos nossos pais, Jair Marcelino da Silva Filho e Jaime Pereira da Silva, que mesmo não estando mais presentes foram os grandes incentivadores para o início deste projeto.

A nossa família pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A nossa orientadora Dra. Dulce Helena Jardim Constantino pelo suporte, amizade e ensinamento no pouco tempo que lhe coube.

A banca examinadora por aceitar o convite em avaliar nosso projeto e colaborar com suas considerações.

Ao corpo docente que nos acompanhou durante esses quatro anos de jornada, colaborando para a nossa formação.

Aos amigos pelo apoio e carinho fornecido não só neste momento, mas em toda a nossa caminhada.

Aos profissionais responsáveis pelo biotério e laboratórios utilizados, pela paciência e ajuda durante a realização do projeto.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da nossa formação, o nosso muito obrigado.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

- Platão

RESUMO

Os tumores sólidos constituem a forma de crescimento tumoral mais comum na espécie humana. Tumores malignos, como o tumor de Ehrlich, são formados por uma massa de células neoplásicas envoltas por um estroma responsável por sua nutrição e suporte. A produção excessiva de eicosanoides derivados do ácido araquidônico tem apresentado influência sobre manifestações inflamatórias e imunes, inclusive no processo de carcinogênese. Este complexo processo envolve o estresse oxidativo, evento este que participa de todas as fases da carcinogênese. Adjunto a isto a melatonina, que apresenta ação antioxidante no organismo, possui a capacidade de diminuir a formação de radicais livres, reduzindo as lesões ao DNA. Este estudo busca relacionar a interação entre melatonina e a 5-lipoxigenase no tumor de Ehrlich, observando a influência que estes fatores exercem no processo da carcinogênese. Para tanto 36 camundongos da linhagem WT foram utilizados, dos quais 18 são selvagens e 18 são nocautes para a enzima 5-lipoxigenase, distribuídos em quatro grupos distintos. Em todos os grupos foi implantado o tumor de Ehrlich: 10^7 células tumorais por via subcutânea. Cada grupo foi constituído de nove animais, sendo os grupos controle tratados com solução fisiológica, 1x/dia, por via oral e os grupos testes tratados com melatonina, 10mg/kg de peso, 1x/dia, por via oral. Ao decorrer de vinte e um dias os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano e a massa tumoral removida, fixada e encaminhada para processamento e coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e ensaio imunoistoquímico. Após as análises foi observado que os animais nocaute (KO) para a enzima 5-lipoxigenase são mais suscetíveis ao desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich, porém o tratamento com melatonina reduziu o crescimento tumoral tanto em animais nocaute quanto em animais selvagens e esta redução tumoral foi associada a uma redução no número de células viáveis. A avaliação para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) não revelou diferenças associadas à contenção tumoral observadas com o tratamento com melatonina, sendo necessários estudos adicionais para esclarecer o mecanismo de inibição de crescimento da melatonina.

Palavras-chave: Melatonina. Lipoxigenase. Tumor de Ehrlich.

ABSTRACT

Solid tumors are the most common form of tumor growth in humans. Malignant tumors such as Ehrlich tumor, consist of a mass of tumor cells surrounded by stromal responsible for its nutrition and support. Excessive production of eicosanoids derived from arachidonic acid has shown influence on inflammatory and immune manifestations, including carcinogenesis. This complex process involves oxidative stress, an event that participates in all stages of carcinogenesis. Adjunct to that melatonin, which has antioxidant action in the body, has the ability to decrease free radical formation, reducing DNA damage. This study seeks to relate the interaction between melatonin and 5- lipoxygenase in Ehrlich tumor, noting the influence these factors have on the carcinogenesis process. For that, 36 mice of the WT lineage were used which 18 are wild and 18 are knockouts for the 5-lipoxygenase enzyme distributed into four different groups. Ehrlich tumor was implanted in all groups: 10^7 tumor cells subcutaneously. Each group consisted of nine animals, and the control groups were treated with saline solution, 1x / day, orally and the test groups treated with melatonin, 10mg / kg body weight, 1x / day, orally. In the course of twenty one days the animals were euthanized by inhalation of isoflurane and the tumor mass removed, fixed and routed for processing and coloration by hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemical assay. After the analyzes it was observed that the knockout animals for the 5-lipoxygenase enzyme are more susceptible to the development of Ehrlich solid tumor, however but the melatonin treatment reduced tumor growth in both knockout and wild animals and this tumor reduction was associated with a reduction in the number of viable cells. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) avaliation didn't reveal differences associated with tumor containment observed with melatonin treatment, and additional studies were needed to elucidate the mechanism of growth of melatonin.

Keywords: Melatonin. Lipoxygenase. Ehrlich tumor.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
3.2	ANIMAL MODELO EXPERIMENTAL	17
3.3	TRATAMENTO	17
3.4	LINHAGEM NEOPLÁSICA	18
3.5	EUTANÁSIA	18
3.6	REMOÇÃO DA MASSA TUMORAL	18
3.7	ESTUDO MORFOMÉTRICO	18
3.8	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	18
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório se apresenta como característica inicial das neoplasias, apresentando os sinais clássicos que são dor, calor, rubor e edema. Os mediadores químicos, que são inicialmente liberados por meio de plaquetas e mastócitos, provocam a vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorece a quimiotaxia de leucócitos, principalmente os neutrófilos e monócitos que tem como principal função combater o agente invasor e realizar a fagocitose de produtos resultantes da lise tecidual (MOLLINEDO,1999).

Após essa fase ocorre a fase proliferativa, onde acontece a angiogênese e a produção de colágeno pelos fibroblastos, com intensa migração celular principalmente de queratinócitos, promovendo a reepitelização. Com a angiogênese e a fibroplasia inicia-se a formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágenos tipo I e III. A resposta inflamatória é modulada através da ação de uma grande variedade de mediadores químicos de natureza lipídica ou proteica. Assume grande importância o ácido graxo, que pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas principais: a via lipoxigenase e a via cicloxigenase (WERNER; GROSE, 2003).

Os ácidos graxos apresentam como principal característica a estruturação da membrana celular e atuam como precursores mensageiros intracelulares mantendo a integridade celular, promovendo a contração vascular, quimiotaxia, adesão e morte celular, inibindo a vasoconstrição e a agregação plaquetária (CURI; HATANAKA, 2007). Também afetam a propriedade física das membranas como sua fluidez, estabilidade e suscetibilidade ao dano oxidativo. A deficiência de AGPI (ácidos graxos poliinsaturados) nos fosfolipídeos das membranas diminui a sua fluidez, e, deste modo, pode alterar as funções das enzimas relacionadas às membranas (ANDRADE; CARMO, 2006).

Esses ácidos graxos, ao sofrerem clivagens através dos fosfolipídeos da membrana, darão origem principalmente ao ácido araquidônico. Para que essa síntese ocorra existem duas vias: a ativação de fosfolipase A₂ ou a metabolização dos fosfatos pela fosfolipase C (RUBIN; FARBER, 2002). O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado que contém 20

carbonos (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico). Não ocorre livre nas células, mas normalmente é esterificado nos fosfolipídeos da membrana (KUMAR, et al, 2010).

Uma vez formado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado de duas formas, sendo elas as vias de cicloxigenase, com produção subsequente de prostaglandinas e tromboxanos, ou a via da lipoxigenase, com formação de leucotrienos e ácidos monoidroxieicosatetraenóicos (HETEs). Esses derivados do ácido araquidônico são conhecidos como eicosanoides. Na via cicloxigenase, as células inflamatórias contêm enzimas cicloxigenase específicas que formam derivados endoperóxidos de ácido araquidônico, como a prostaglandina G_2 (PGG_2) e prostaglandina H_2 (PGH_2). Os endoperóxidos mostram-se instáveis e, dependendo da célula inflamatória ou do tecido, são novamente metabolizados a prostaglandinas mais estáveis, como a PGI_2 (prostaciclina), prostaglandina E_2 (PGE_2) e tromboxano A_2 (TxA_2) (RUBIN; FARBER, 2002).

As prostaglandinas estão envolvidas em relações vasculares e sistêmicas da inflamação e são produzidas pelos mastócitos, macrófagos, células endoteliais e muitos outros tipos celulares pela ação de duas cicloxigenases, a constitutivamente expressa COX-1 e a enzima induzida (KUMAR, et al, 2010).

A PGI_2 e a PGE_2 possuem efeito vasodilatadores e já foram utilizadas na prática clínica para incrementar a perfusão tecidual e aumentar a oxigenação sanguínea (RUBIN; FARBER, 2002). O TxA_2 é um potente agente agregador plaquetário, é instável e converte-se rapidamente em sua forma inativa TxB_2 (COTRAN; KUMAR; COLLINS; ROBBINS, 2000).

A segunda via de metabolização do ácido araquidônico é a lipoxigenase, onde os produtos iniciais são gerados por três lipoxigenases (LO) diferentes e que estão presentes em apenas alguns tipos de células. A 5-lipoxigenase (5-LO) é a enzima predominante nos neutrófilos. À ativação celular, a 5-LO transfere-se para a membrana nuclear e interage com uma proteína reguladora associada à membrana, denominada proteína ativadora de 5-LO (FLAP), para formar o complexo enzimático ativo (COTRAN; KUMAR; COLLINS; ROBBINS, 2000).

O derivado 5-hidroperoxi de ácido araquidônico, 5-HPETE, é bastante instável, sendo reduzido para 5-HETE, que é quimiotático para neutrófilos ou é convertido em leucotrienos. O primeiro leucotrieno gerado a partir do 5-HPETE é denominado leucotrieno A_4 (LTA_4), que contém três ligações duplas conjugadas e serve como precursor para outras moléculas de leucotrieno. O LTB_4 é um potente quimiotático e causa a agregação de neutrófilos, aderência de

leucócitos ao endotélio venular, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas. Pode também originar o leucotrieno C₄ (LTC₄) por adição de glutatona, em especial nos mastócitos, basófilos e macrófagos. Os leucotrienos D₄ (LTD₄) e E₄ (LTE₄) são formados, respectivamente, após a remoção em série dos aminoácidos glicina e glutamina, e são conhecidos, em conjunto, como substâncias de reação lenta da anafilaxia (SRS-A) (RUBIN; FARBER, 2002).

Os neutrófilos também produzem triidroximetabólitos de ácido araquidônico que são denominados lipoxinas. As plaquetas por si só não formam lipoxinas, mas, quando interagem com leucócitos, podem formar o metabolismo a partir de intermediários derivados de neutrófilos. (COTRAN; KUMAR; COLLINS; ROBBINS, 2000).

As principais ações das lipoxinas são de inibir o recrutamento dos leucócitos e componentes celulares da inflamação, inibir a quimiotaxia e a adesão dos neutrófilos ao endotélio, mas estimular a aderência dos monócitos. Existe uma relação inversa entre a produção de lipoxina e leucotrienos, sugerindo que as lipoxinas podem ser reguladores negativos endógenos dos leucotrienos e podem então ter um papel na resolução da inflamação (KUMAR, et al, 2010).

Os eicosanoides estão relacionados com a iniciação e promoção do câncer, a proliferação celular e a metástase tumoral, promovendo a sobrevivência celular, modulando a adesão, a motilidade celular e a angiogênese, aumentando a permeabilidade vascular e a inflamação e apresentando, deste modo, um importante papel na promoção e crescimento do tumor. Diversos polimorfismos foram identificados em genes das vias lipoxigenase e cicloxigenase que podem estar relacionados a este processo, sendo os ácidos graxos mais efetivos nos estágios iniciais da carcinogênese (MARTINS; GRUEZO, 2008).

O processo inflamatório e a resposta imunitária aos tumores são influenciados por hormônios endógenos que funcionam como moduladores desta resposta.

O principal hormônio liberado pela glândula pineal, a melatonina - MEL, foi isolada pela primeira vez em 1958. É produzida e secretada pelos pinealócitos da glândula pineal, seguindo um padrão rítmico, com pico secretório no período noturno e quase nenhuma síntese no período diurno. Através da regulação do ritmo circadiano, a secreção de melatonina está intimamente sincronizada com o período de sono. Após a pinealectomia, a melatonina ainda pode ser detectada no plasma, na urina e no hipotálamo, persistindo o seu ritmo de secreção, porém com

redução de amplitude dos níveis séricos. Além da glândula pineal, a melatonina já foi isolada na retina, em células do trato gastrointestinal, hemácias humanas, dentre outros (NETO; SCALDAFERRI, 2004).

A biossíntese da melatonina nos pinealócitos ocorre através de seu precursor, o aminoácido triptofano, pouco abundante em dietas regulares. A enzima triptofano hidroxilase (TH) converte o triptofano, ativamente transportado através da membrana celular, em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). A 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) remove o grupo alfacarboxil terminal do 5-HTP e o transforma em serotonina. Níveis elevados de serotonina são detectados em mamíferos durante o dia, decaindo durante a fase noturna. A N-acetiltransferase (NAT) catalisa a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). A enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) catalisa a reação de conversão do NAS em 5-metoxi-triptamina, conhecida como melatonina (MAGANHIN et al, 2008).

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

As primeiras correlações entre o combate ao câncer e a glândula pineal datam do final do século XIX, quando alguns médicos já ofereciam extratos da glândula a seus pacientes oncológicos. Outro estudo realizado em 1981 injetou o DMBA (7, 12-dimetil-benzo-antraceno), uma substância que estimula o aparecimento de câncer de mama, em ratas previamente divididas entre dois grupos, sendo que um receberia a melatonina e outro não. Ao fim de noventa dias, 50% das ratas que não receberam melatonina apresentaram tumores, ao passo que nenhuma rata que recebeu o hormônio desenvolveu tumores. (NETO; SCALDAFERRI, 2004).

A redução na produção endógena da melatonina pode contribuir para a progressão do tumor, pois esse hormônio possui ação antineoplásica, além de ser capaz de bloquear a absorção de fatores de crescimento pelas células neoplásicas e reduzir a ação da telomerase, resultando assim na apoptose da célula (BLASK, 2009).

Os tumores malignos, que antes eram vistos como componentes de células com alta capacidade proliferativa são caracterizados hoje por pertencer a um sistema complexo que

consiste não apenas de células neoplásicas, mas também de vários tipos de células estromais (QUANTE et al., 2011).

O estroma, composto por tecido conjuntivo e os vasos sanguíneos, em tecidos normais apresenta constituição diferenciada em relação ao estroma tumoral. Sua modificação ocorre através da expressão de fatores de crescimento, causando alterações na matriz extracelular, proliferação de fibroblasto, recrutamento de células inflamatórias e induzindo a angiogênese. Tais modificações desempenham um papel chave no microambiente tumoral (SHIMODA et al., 2010).

Este ambiente contém tanto células da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer (NK) quanto células da imunidade adaptativa, como os Linfócitos T e B, que irão infiltrar-se no tumor (com exceção da célula NK), estimulando a progressão tumoral e a liberação de citocinas e fatores de necrose tumoral (HORIMOTO, et al., 2012).

As neoplasias malignas são caracterizadas por apresentar um parênquima (região onde células tumorais vivas se encontram em fase contínua de proliferação), que apresentam células atípicas, com núcleos atípicos e multinucleados, caracterizando uma falha no processo de divisão celular durante a anáfase. Ocorre também a presença de hipercromasia, uma intensa afinidade do núcleo pelo corante de caráter ácido (hematoxilina) que aparece marcante em tumores malignos, bem como figuras de mitose e meiose atípicas no interior do parênquima tumoral. (SANTOS; CONSTANTINO, 2015).

Isolado por Paul Ehrlich em 1886, o tumor de Ehrlich (TE) foi descrito em 1906 como carcinoma mamário de camundongos fêmeas e tem sido extensamente aplicado como modelo em oncologia experimental, devido as suas características e facilidade de manuseio experimental (DAWE, 1982).

Histologicamente, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose, ocupando a porção central na massa tumoral e são infiltradas por neutrófilos que, além de possuir relação com a remoção das células mortas, desempenham papel na sinalização e ativação de macrófagos. Também são comumente observadas intensa atipia e células extremamente anaplásicas (D'AGLI et al, 1992).

Neste estudo pretendemos investigar a interação do hormônio melatonina em animais portadores do tumor experimental de Ehrlich, empregando para tanto animais selvagens e nocaute

para a enzima 5-lipoxigenase. Esta enzima é responsável pelo metabolismo do ácido araquidônico e geração dos leucotrienos, importantes mediadores inflamatórios. Este estudo é de fundamental importância, pois pretende esclarecer o envolvimento destes metabólitos em associação com a suplementação de melatonina e o seu efeito no crescimento tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como principal objetivo investigar a interação do hormônio melatonina com a enzima 5-lipoxigenase no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o crescimento tumoral em animais nocaute para a enzima 5-lipoxigenase tratados com melatonina;

2.2.2 Comparar o crescimento tumoral em animais nocaute para a enzima 5-lipoxigenase tratados com melatonina com animais nocaute para a enzima 5-lipoxigenase tratados com solução fisiológica e animais selvagens tratados com melatonina ou com solução fisiológica;

2.2.3 Quantificar a expressão do marcador de proliferação tumoral – PCNA em todos os grupos experimentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Para a realização deste estudo foram utilizados 18 camundongos WT/J selvagens e 18 camundongos WT/J nocautes para a enzima 5-LO, distribuídos em quatro grupos distintos. Em todos os grupos foi implantado o tumor de Ehrlich: 10^7 células tumorais por via subcutânea. Cada grupo foi constituído de nove animais, tratados obedecendo ao seguinte esquema: G1:selvagem, solução fisiológica, 1x/dia, por via oral (VO); G2: selvagem, melatonina, 10mg/kg de peso, 1x/dia, VO; G3: nocaute, solução fisiológica, 1x/dia, VO; G4: nocaute, melatonina, 10mg/kg de peso, 1x/dia, VO. Ao decorrer de vinte e um dias os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano em câmara apropriada com taxa de saturação de 4% e a massa tumoral removida, fixada e encaminhada para processamento e coloração pela HE e ensaio imunoistoquímico.

3.2 Animal modelo experimental

Neste estudo foram utilizados dezoito camundongos da linhagem selvagem WT/J, fêmeas e dezoito camundongos da mesma linhagem nocautes para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO), com sessenta dias de idade, obtidos do Biotério da Universidade do Sagrado Coração . 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 e ração comercial específica para camundongos. Foram mantidos no biotério da universidade, sob condições ambientais da sala de experimentação: temperatura ($21 \pm 3^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar ($50 \pm 20\%$) e período de 12/12 horas claro/escuro.

3.3 Tratamento

Os animais foram tratados com melatonina ou com solução fisiológica durante vinte e um dias no período da manhã (onze horas). 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, no volume de 0,1mL, via ora, 1x/dia. A melatonina foi diluída em solução fisiológica para administração.

3.4 Linhagem neoplásica

Foi utilizado o Tumor Sólido de Ehrlich, mantido no Biotério da Universidade do Sagrado Coração. 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.

3.5 Eutanásia

Decorridos vinte e um dias de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de eutanásia com isoflurano, através da inalação, em taxa de saturação 4%. Este procedimento promove o mínimo de estresse e dor nos animais, sendo recomendado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação animal (CONCEA), Protocolo CEUA nº 9269020516.

3.6 Remoção da massa tumoral

Após a eutanásia os animais foram posicionados em decúbito dorsal, foi realizada a palpação para localização do tumor e antissepsia do local com etanol a 70%, Com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica a massa tumoral foi removida e imediatamente fixada em formol a 10% por 24h. Posteriormente o formol foi substituído por etanol a 70% e as peças encaminhadas para o serviço de histotécnica da seção de Pós-Graduação da USC.

3.7 Estudo morfométrico

Cortes histológicos corados pela HE foram fotomicrografados (foto microscópio Nikon, modelo Eclipse 801; com captura de imagem por uma câmera de alta resolução). As imagens capturadas foram analisadas através do software Image Pro-Plus, versão 5.1 (Media Cybernetics).

3.8 Análise imunoistoquímica

Para marcação do fator de proliferação tumoral (PCNA) foi empregado o anticorpo primário anti PCNA (Santa Cruz Biotechnology) em diluição a ser ajustada e padronizada. Como anticorpos secundários foram empregados anticorpos biotinilados específicos e a amplificação do sinal da reação foi realizada utilizando-se o complexo avidina biotina - ABC (Vector

Laboratories), na diluição de 1:200 e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Na sequência, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por dois minutos e a quantificação do fator PCNA foi realizada por morfometria.

3.9 Análise estatística

Neste estudo empregamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para análise das variáveis tratamento e linhagem do animal.

4. RESULTADOS

Com o desenvolvimento deste estudo pudemos constatar que no grupo de animais nocaute para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO) o tumor sólido de Ehrlich apresentou um crescimento significativamente maior quando comparado ao grupo de animais da linhagem WT selvagem. Ao tratarmos estes animais deficientes de 5-LO com melatonina, constatamos significativa redução no crescimento tumoral. No grupo da linhagem WT selvagem, além de constatarmos um crescimento reduzido do tumor em animais tratados com solução fisiológica, o tratamento com melatonina foi capaz de reduzir o tumor. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 1 e figuras 1 e 6.

TABELA 1 - Área total do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina em camundongos da linhagem WT selvagem e WT nocaute (KO) para a enzima 5- lipoxigenase (5-LO)

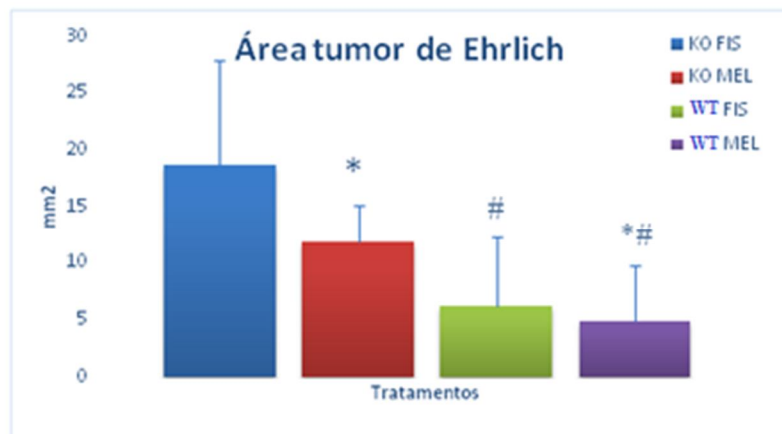
TRATAMENTOS ^a	ÁREA TOTAL (mm ²)
<i>KO 5-LO FIS</i> ^c	18,65 ± 9,18 ^b
<i>KO 5-LO MEL</i>	11,79 ± 3,28*
<i>WT FIS</i>	6,17 ± 6,15#
<i>WT MEL</i>	4,86 ± 4,87*#

Fonte: Elaborada pelos autores.

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= 5 animais;
- * p < 0,05 na comparação de indivíduos da mesma linhagem com variação do tratamento;
- # p < 0,05 na comparação de indivíduos de linhagens diferentes com o mesmo tratamento.

Figura 1. Área total do tumor de Ehrlich.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Outro parâmetro histopatológico avaliado neste estudo foi a área de necrose, onde encontram-se células mortas e que sofreram alterações morfológicas que caracterizam a necrose de coagulação. Observamos significativas áreas de necrose no grupo nocaute para a enzima 5-LO tratado com solução fisiológica, porém, com o tratamento utilizando melatonina, as dimensões das áreas de necrose foram reduzidas para valores semelhantes aos encontrados nos grupos WT selvagem tratados com solução fisiológica ou melatonina. Estes dados estão demonstrados na tabela 2 e figura 2.

TABELA 2 - Área de necrose do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina em camundongos da linhagem WT selvagem e WT nocaute (KO) para a enzima 5- lipoxigenase (5-LO)

TRATAMENTOS ^a	Necrose (mm ²)
<i>KO 5-LO FIS</i> ^c	9,65 ± 4,61 ^b
<i>KO 5-LO MEL</i>	2,70 ± 1,4*
<i>WT FIS</i>	3,16 ± 3,46
<i>WT MEL</i>	3,12 ± 1,25#

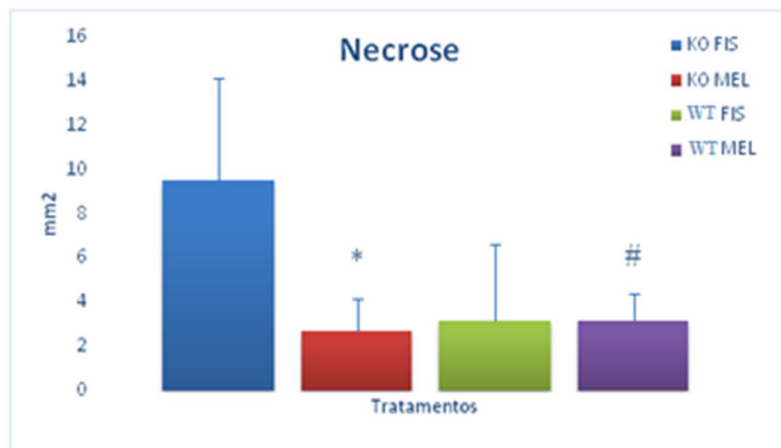
Fonte: Elaborada pelos autores.

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= 5 animais;
- * p < 0,05 na comparação de indivíduos da mesma linhagem com variação do tratamento;

- e. # $p < 0,05$ na comparação de indivíduos de linhagens diferentes com o mesmo tratamento.

Figura 2. Área de necrose do tumor de Ehrlich.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Ao compararmos as áreas de parênquima, onde encontramos células tumorais vivas em proliferação constante, observamos que o grupo nocaute para a enzima 5-LO tratado com solução fisiológica apresenta significativo aumento nesta área, sendo tal fato afetado pelo tratamento com melatonina. Porém, as áreas de parênquima nos grupos WT selvagens tratados com solução fisiológica ou melatonina correspondem a cerca de 30% daquele observado no grupo nocaute para 5-LO tratado com melatonina. Não observamos diferença significativa relacionada ao tratamento com melatonina nos animais da linhagem WT selvagem. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 3 e figura 3.

TABELA 3 - Área de parênquima do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina em camundongos da linhagem WT selvagem e WT nocaute (KO) para a enzima 5- lipoxigenase (5-LO)

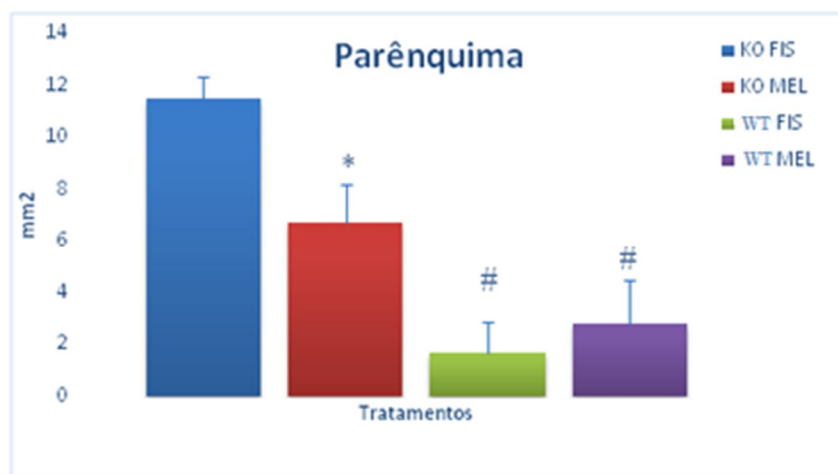
TRATAMENTOS ^a	ÁREA TOTAL (mm ²)
<i>KO 5-LO FIS^c</i>	11,5 ± 0,83 ^b
<i>KO 5-LO MEL</i>	6,74 ± 1,48*#
<i>WT FIS</i>	1,67 ± 1,16
<i>WT MEL</i>	2,78 ± 1,7#

Fonte: Elaborada pelos autores.

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 \pm desvio padrão;
- N= 5 animais;
- * $p < 0,05$ na comparação de indivíduos da mesma linhagem com variação do tratamento;
- # $p < 0,05$ na comparação de indivíduos de linhagens diferentes com o mesmo tratamento.

Figura 3. Área de parênquima do tumor de Ehrlich.



Fonte: Elaborada pelos autores.

A marcação imunohistoquímica do PCNA foi significativamente mais intensa no grupo nocaute para a enzima 5-LO tratado com melatonina. Em todos os demais grupos, independente do tratamento, a intensidade de marcação foi semelhante. Estes dados se encontram demonstrados na tabela 4 e figuras 4 e 5.

TABELA 4 – Intensidade de marcação do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular – PCNA no parênquima do tumor sólido de Ehrlich em função do tratamento com solução fisiológica e melatonina em camundongos da linhagem WT selvagem e WT nocaute (KO) para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO)

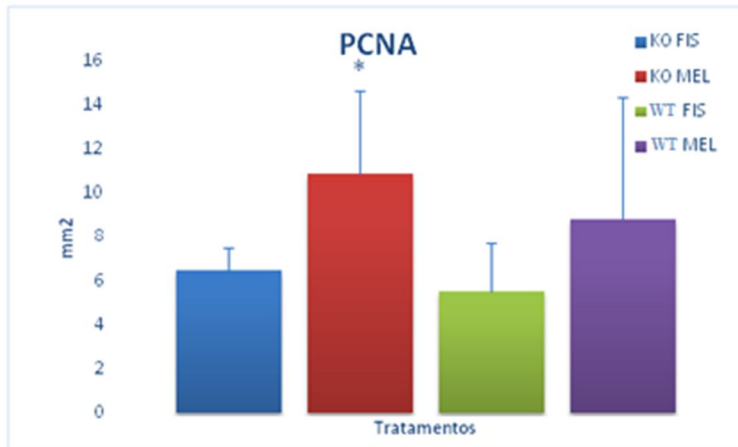
TRATAMENTOS ^a	PCNA x 10 ⁻³ (mm ²)
KO 5-LO FIS ^c	6,52 \pm 1,03 ^b
KO 5-LO MEL	10,93 \pm 3,75*
WT FIS	5,56 \pm 2,15
WT MEL	8,86 \pm 5,44

Fonte: Elaborada pelos autores.

Nota:

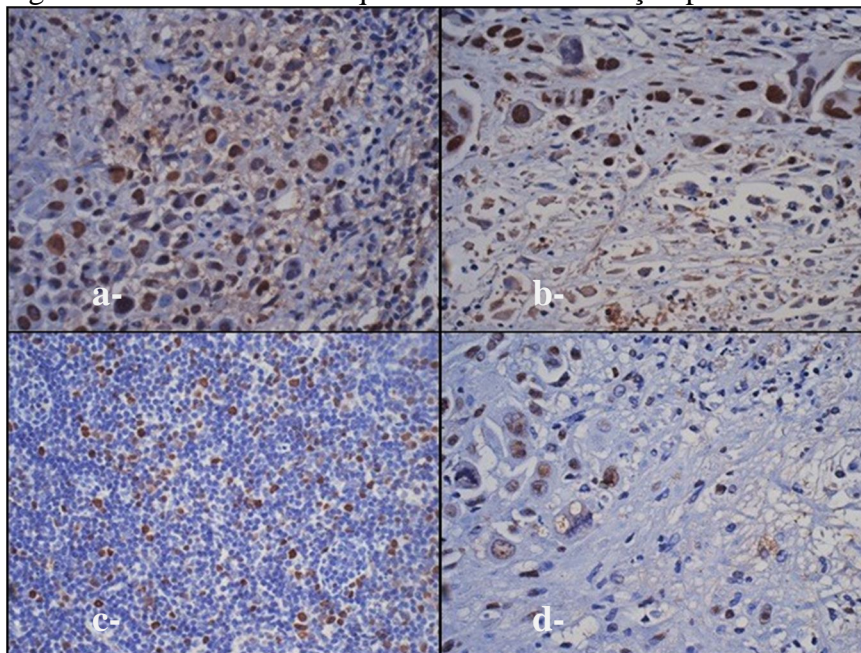
- Animais foram tratados por um período total de vinte e um dias, com solução fisiológica, via oral, 0,1mL, 1x/dia ou com melatonina 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia.
- Resultados expressos em média \pm desvio padrão;
- N= 5 animais;
- * $p < 0,05$ na comparação de indivíduos da mesma linhagem com variação do tratamento.

Figura 4. Intensidade marcação PCNA no parênquima do tumor de Ehrlich.



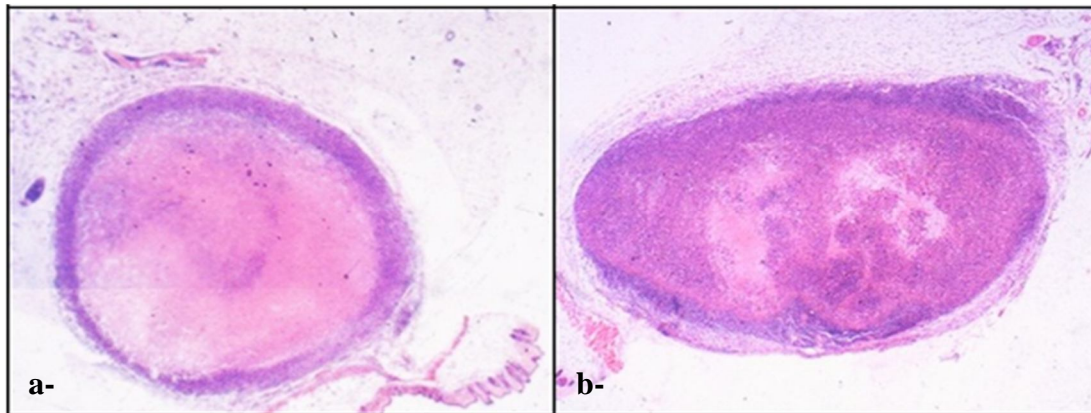
Fonte: Elaborada pelos autores.

Figura 5. Estudo imunoistoquímico: imunomarcação para PCNA no tumor sólido de Ehrlich.



a- grupo WT selvagem tratado com solução fisiológica, , via oral, 0,1mL, 1x/dia; **b-** WT nocaute tratado com solução fisiológica, , via oral, 0,1mL, 1x/dia; **c-** grupo WT selvagem tratado com melatonina, 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia; **d-** WT nocaute tratado com melatonina, 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia.

Figura 6. Tumor de Ehrlich



a- grupo WT selvagem tratado com melatonina, 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia;
b- grupo WT nocaute tratado com melatonina, 10mg por kg de peso animal, via oral, 0,1mL, 1x/dia.

5. DISCUSSÃO

Este estudo revelou dados importantes sobre a relação entre a participação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) em função do tratamento ou não com o hormônio melatonina, sobre o crescimento tumoral.

A enzima 5-LO gera uma série de metabólitos envolvidos na resposta imune inata e na defesa antitumoral. As lipoxigenases utilizam como substrato o ácido araquidônico, o mesmo substrato utilizado pelas enzimas cicloxigenases, também envolvidas na resposta de defesa antitumoral. O papel tanto das lipoxigenases quanto das cicloxigenases pode ser relacionado a uma ação antitumoral e ora pode ser associado a uma ação pró-tumoral. Esta dualidade está relacionada ao tipo de tumor e a fase evolutiva na qual se encontra.

Utilizamos como um dos parâmetros para avaliar o crescimento tumoral a área total e notamos que os animais nocaute para 5-LO apresentaram crescimento aumentado e que este crescimento está associado, em nosso modelo experimental, a um aumento do parênquima tumoral, onde encontramos células vivas e muitas figuras de mitose. A ausência da enzima 5-LO resulta em um desvio do substrato ácido araquidônico, para ser consumido pela enzima cicloxigenase. O principal derivado das cicloxigenases é a prostaglandina E (PGE_2), esta tem papel inibidor de células de defesa e é angiogênica, resultando em maior nutrição do tumor.

As prostaglandinas são mediadores lipídicos compostos por 20 carbonos que desempenham diversas atividades biológicas. A PGE_2 , por exemplo, é a mais abundante prostaglandina produzida em vários tumores. A produção de PGE_2 ocorre em consequência da atividade de COX-2. Em algumas células tumorais, as prostaglandinas sintetizadas via COX-2 interagem com receptores celulares, estimulando sua proliferação, impedindo que entrem em apoptose, estimulando a expressão de fatores angiogênicos. Essas alterações, em conjunto, conferem às células tumorais crescimento autônomo e vascularização independente. (VILELA, 2007).

Muitos mecanismos têm sido relacionados comparando o provável efeito dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) como terapia anti-câncer, dentre eles a inibição da síntese de prostaglandinas (que possui papel fundamental na manutenção do tumor). Dentre os principais papéis das prostaglandinas no desenvolvimento do câncer estão a ação imunossupressora, a promoção de angiogênese e a inibição da apoptose celular. Altas quantidades de prostaglandinas

produzidas por alguns tumores são também capazes de causar inibição da migração de células de defesa do nosso organismo. A partir do conhecimento de que muitos tipos de neoplasias epiteliais expressam COX-2 e apresentam níveis elevados de PGE₂, a estratégia de bloqueio da expressão desta COX no tratamento do câncer parece um procedimento lógico para muitos pesquisadores (BRANDÃO, 2007).

À medida que o tumor se desenvolve, novos vasos se formam para suprir as células tumorais de nutrientes e remover produtos do metabolismo celular. A angiogênese está frequentemente associada com prognóstico pior. Estudos mostram que tumores com maior vascularização são mais agressivos e invasivos. A inibição da angiogênese é uma estratégia para inibir ou limitar o crescimento do tumor. A prostaglandina E₂ promove a sobrevivência das células tumorais e é encontrada em concentrações maiores nas células tumorais que nas células normais (CORREIA; CARMO, 2009).

Com a inibição da COX-2 através dos AINEs, ocorre também o impedimento da formação de PGE₂ no tecido tumoral, prevenindo a estimulação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor), que induz a angiogênese, estimulando indiretamente o crescimento e expansão da célula neoplásica. As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, por exemplo, vasodilatação ou vasoconstrição, hipotensão, crescimento e desenvolvimento nervoso, resposta imunológica, regulação da atividade quimiotática celular e angiogênese. (CARVALHO; RIO-SANTOS; CARVALHO, 2004).

O tratamento com melatonina foi capaz de reduzir as dimensões tumorais tanto em animais 129 nocautes para 5-LO quanto nos da linhagem 129 selvagem. Estudos recentes relacionam a melatonina com aumento na expressão do gene bax e repressão bcl-2, resultando em aumento na produção da caspase-3, portanto um efeito pró-apoptótico. Os autores apontam para a melatonina como um futuro agente terapêutico em certos tumores, especialmente os de origem mamária (LI et al., 2016).

Inicialmente a melatonina estava associada à promoção do sono, reorganização do sistema circadiano endógeno e à regulação dos ciclos reprodutivos sazonais. Atualmente vem apresentando uma elevada capacidade antioxidante, atividade neuroprotetora e anticancerígena. A sua ação antiproliferativa sobre as células tumorais é a mais evidenciada, envolvendo mecanismos dependentes e/ou independentes de receptores. Dependendo do tipo de câncer a

antiproliferação induzida pela melatonina atua por um mecanismo específico. Além disso, a melatonina parece também inibir a disseminação e a formação de novas lesões tumorais, ou seja, metástases. Esta ação pode ser explicada pela capacidade da mesma em aumentar a produção de moléculas de adesão na superfície celular. Vários estudos têm apontado a inibição da absorção ácido linoleico como um possível mecanismo pelo qual a melatonina inibe a proliferação de células tumorais (BOTAS, 2014).

Os efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina podem estar relacionados às suas propriedades bioquímicas e/ou metabólicas e uma série de estudos foram realizados a fim de desvendar seu mecanismo de ação. O complexo processo de carcinogênese ocasionalmente envolve o estresse oxidativo. Estudos comprovaram a atividade antioxidante da melatonina. O esquema mais simples de carcinogênese envolve três etapas: iniciação, promoção e progressão; e o estresse oxidativo participa de todas elas. A ação antioxidante da melatonina diminui a formação de radicais livres, reduzindo as lesões ao DNA. Outro importante efeito é sua capacidade de diminuir os efeitos colaterais da quimioterapia oncológica. Estudos posteriores, em humanos, demonstraram que a melatonina tem efeito protetor contra as reações adversas da quimioterapia, especialmente os efeitos mielossupressores e neurotóxicos (NETO; SCALDAFERRI, 2005).

Em cultura, a melatonina inibe a proliferação de células de câncer de mama humanas (MCF-7), induzindo uma parada no ciclo celular dependente de um aumento da expressão da p21WAF1 proteína, que é mediado pela via p53, desequilibrando o processo entre mitose e apoptose. Outros estudos evidenciaram que a melatonina não é capaz de influenciar no crescimento de tumores e no surgimento de metástases, porém, quando usada como adjuvante no tratamento de câncer tem bons resultados no controle da doença (FERREIRA et.al, 2010).

Em 1981, Tamarkin et al., (1981) demonstraram que o tratamento com melatonina inibiu o desenvolvimento de tumores mamários induzidos pelo carcinógeno 7,12-dimethylbenz(alpha)-anthracene (DMBA) em ratas Sprague Dawley, e, ao contrário, a remoção da glândula pineal estimulou o desenvolvimento desses tumores. No mesmo ano, Bartsch et al., (1981) demonstraram que pacientes com câncer de mama apresentam diminuição nos níveis plasmáticos de melatonina. A melatonina pode controlar o ciclo celular, atuando como pró-apoptótica e anti-proliferativa e induzindo a diferenciação celular. Possui importante ação antioxidante, reduzindo os danos oxidativos provocados por radicais livres e prevenindo o efeito colateral de tratamentos

citotóxicos. Também tem sido demonstrado que a melatonina pode atuar na angiogênese direta ou indiretamente, inibindo a proliferação de células endoteliais e de fatores pró-angiogênicos (JARDIM-PERASSI, 2014).

Neste estudo, embora a área tumoral tenha sido contida pelo tratamento com melatonina nos animais nocaute para a enzima 5-LO, observamos um aumento da produção da PCNA, um indicador de proliferação associado à agressividade do tumor.

A PCNA é uma proteína nuclear não-histona ligada à replicação de DNA, também conhecida como ciclina, com peso molecular de 36kDa, e papel na iniciação da proliferação celular por aumento da enzima DNA polimerase. A proteína, de dois tipos, regula o ciclo celular: uma presente no nucleoplasma e em baixo nível nas células quiescentes e outra associada aos sítios de replicação do DNA. Aumenta de duas a três vezes entre as fases G1 e S (síntese), atinge platô na fase G2 e cai em G2/M (mitose) (MALKAS et al, 2006).

6. CONCLUSÃO

- Animais nocaute para a enzima 5-LO são mais suscetíveis ao desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich;
- O tratamento com melatonina reduz o crescimento tumoral tanto em animais nocaute quanto em animais selvagens, portanto o mecanismo de ação da melatonina não pode ser associado, neste modelo, à enzima - LO;
- A redução tumoral foi associada a uma redução no número de células viáveis;
- A avaliação PCNA não revelou diferenças associadas à contenção tumoral observadas com o tratamento com melatonina;
- Estudos adicionais são necessários para esclarecer o efeito inibitório de crescimento da melatonina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE P.M.M.; CARMO M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Rev Mn-Metabólica**. 2006, 8(3):135-43.

BLASK, D. E. Melatonin, Sleep Disturbance and Cancer Risk. **Sleep Medicine Reviews**, 2009. 13: 257-264.

BOTAS, F. M. C. **O papel da melatonina**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2014.

BRANDÃO, L. O uso de antiinflamatórios na terapia do câncer em cães. **Merrial Saúde animal**, 2007. Disponível em <<http://www.webvet.com.br/artigos-tecnicos/Artigos/o-uso-de-aintiinflamatorios-na-terapia-do-cancer-em-caes.pdf>>. Acesso em 8 out. 2016.

CARVALHO, W.A.; RIO-SANTOS,F.; CARVALHO, R.D.S. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestologia**, 2004,4:448-64.

CORREIA, M.I; CARMO, M.C. A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2009; 55(3):279-87.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S.L. . **Patologia Estrutural e Funcional** . 6ª Edição: Guanabara Koogan, 2000.

CURI, R.; HATANAKA,H. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 2007;88(2):53-8.

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.

DAWE, C. J. Comparative neoplasia. In **HOLLAND J.F. & FREI III, E. CANCER MEDICINE**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. 209.

FERREIRA, C.S. et.al. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.56, n.6, p.715-718, 2010.

HORIMOTO, Y. et al. Emerging roles of tumor-associated stroma in promoting tumor metastasis. **Cell Adh Migr**. 2012. 6(3): 193-203.

JARDIM-PERASSI, B. V. **Avaliação da angiogênese em resposta ao tratamento com melatonina no câncer de mama: estudo in vitro e in vivo**. 2014. 122 (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Programa, de Pós-Graduação em Genética, São José do Rio Preto, 2 fev. 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; NELSON,F.; ROBBINS, S.L.; COTRAN,V. **Patologia: Bases Patológicas das doenças**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010.

LI, W. et al. Melatonin induces cell apoptosis in Mia PaCa-2 cells via the suppression of nuclear factor- κ B and activation of ERK and JNK: A novel therapeutic implication for pancreatic cancer. **Oncol Rep.**, 2016, 36 (5), 2861-2867.

MAGANHIN, C.C. et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, 2008, v. 54, n. 3, p. 267-71.

MALKAS, L.H. et al. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. **National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006, 103 (51): 19472-7.

MARTINS, J.M.; GRUEZO, N.D. Ácido graxo W-6 na etiologia do câncer de colon e reto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2009; 55(1): 69-74.

MOLLINEDO, F.; BORREGAARD,N.; BOXER, L.A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunol Today**,1999, v 20, n 12, p.535-537.

NETO, J.A.S.; SCALDAFERRI, P.M. Melatonina e câncer - revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2005, 51:49–58.

QUANTE, M. et al. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. **Cancer Cell**. 2011. 19(2): 257-272.

RUBIN, E ; FARBER, J.L.. **Patologia**. 3ª Edição. Editora Guanabara Koogan,2002.

SHIMODA, M; MELLODY, K.T; ORIMOTO,A. **Carcinoma-Associated Fibroblast are a Rate-Limiting**. Semin Cell Dev Biol. 2010. 21(1): 19–25.

SANTOS, D. M.; CONSTANTINO, D. H. J. Efeito do tratamento com melatonina sobre a produção de metástases neoplásicas. **SALUSVITA**, Bauru, v. 34, n. 1, p. 7186, 2015.

VILELA, L.C. **Atividade das ciclooxigenases e síntese de prostaglandina E2 em linhagens de adenocarcinoma mamário humano e em células do tumor ascítico de Ehrlich**. 2007. 44 f Tese (Doutorado em Patologia) Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu – São Paulo, 2007.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev** , 2003, v 3, n 83, p.835-870.