

# ATIVIDADE ANTITUMORAL DA MELATONINA SOBRE O TUMOR DE EHRlich IMPLANTADO EM CAMUNDONGOS SWISS

*Melatonin antitumor activity on Ehrlich tumor  
implanted in Swiss mice*

Danielle Dutra Pereira<sup>1</sup>

Laíse de Souza Elias<sup>1</sup>

Thaís Heloíse da Silva Almeida<sup>1</sup>

Wanessa Noady Ketry de Oliveira<sup>1</sup>

Priscila Maria do Santos Oliveira<sup>2</sup>

Jeine Emanuele Santos da Silva<sup>3</sup>

George Chaves Jimenez<sup>4</sup>

Joaquim Evencio Neto<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Biociência  
Animal, Universidade Federal  
de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Mestre em Biociência Animal,  
Universidade Federal Rural  
de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Professora Doutora da área de  
Biofísica, Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Professor Doutor da área de  
Farmacologia, Universidade  
Federal Rural de Pernambuco,  
Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>5</sup>Professor Doutor da área de  
Histologia, Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, Recife,  
Pernambuco, Brasil.

Recebido em: 16/09/2019

Aceito em: 26/12/2019

PEREIRA, Danielle Dutra *et al.* Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de *Ehrlich* implantado em camundongos swiss. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 4, p. 911-938, 2019.

## RESUMO

**Introdução:** Um mecanismo proposto para a ação oncostática da melatonina no tumor de mama é a inibição do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), dificultando assim a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) e, conseqüentemente, reduzindo a produção ovariana de estradiol. **Objetivo:** Avaliar a atividade antitumoral da melatonina sobre o

tumor de Ehrlich em camundongos fêmeas Swiss, através de sua interação com o aparelho reprodutor. **Método:** Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), de 60 dias de idade, divididas em sete grupos experimentais (n = 8 animais/grupo): A- Pinealectomizados tratados com melatonina; B- Sham-pinealectomizados tratados com melatonina; C- Pinealectomizados sem tratamento; D- Sham-pinealectomizados sem tratamento; E- Pinealectomizados tratados com veículo da melatonina; F- Sham-pinealectomizados tratados com veículo da melatonina; G- Controle. **Resultados e Discussão:** Alterações ovarianas foram significativas entre os grupos, observando-se um aumento no peso dos ovários e no número de folículos ovarianos dos animais pinealectomizados, enquanto os animais sham-pinealectomizados apresentaram um maior número de corpos lúteos. Os animais pinealectomizados apresentaram maior taxa de crescimento tumoral quando comparados aos animais tratados com melatonina, tendo estes últimos apresentado também uma percentagem de inibição tumoral. **Conclusão:** A análise destes resultados nos permite concluir que a melatonina, através de sua atuação no ovário, interfere nos mecanismos regulatórios dos processos de crescimento do tumor de Ehrlich. Pode-se conjecturar que eventuais alterações nos padrões de ritmicidade endógena para a melatonina pode predispor os organismos a uma maior incidência de tumor.

**Palavras-chave:** Melatonina. Neoplasia. Pinealectomia

## ABSTRACT

**Introduction:** *A proposed mechanism for the oncostatic action of melatonin in breast tumors is the inhibition of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), thus hindering the release of luteinizing hormones (LH) and stimulating follicle (FSH) and, consequently, reducing ovarian estradiol production.* **Objective:** *This study aim was to evaluate the melatonin antitumor activity on the Ehrlich tumor in female Swiss mice, through its interaction with the reproductive system.* **Method:** *we used 56 female Swiss mice (*Mus musculus*), 60 days of age, were divided into seven experimental groups (n = 8 animals/group): A- Pinealectomized melatonin treated; B- Sham-pinealectomized melatonin treated; C- Pinealectomized no treated; D- Sham-Pinealectomized no treated; E- Pinealectomized melatonin vehicle treated; F- Sham-pinealectomized melatonin vehicle treated; G- Control.* **Results and discussion:** *Ovarian changes were*

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra et al. Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de Ehrlich  
implantado em  
camundongos swiss.  
SALUSVITA, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

*significant between the groups, observing an increase in ovarian weight and follicles number in pinealectomized animals, whereas the sham-pinealectomized animals exhibited greater numbers of corpus luteum. The pinealectomized animals had higher rate of tumor growth than melatonin treated animals, the last having also presented a percent inhibition of the tumor. **Conclusion:** Analysis of these results allows us to conclude that melatonin, through its actions in the ovary interfere with regulatory mechanisms of the processes of Ehrlich tumor growth. May conjecture that any changes in the patterns of endogenous rhythmicity for melatonin, can predispose organisms to a higher incidence of tumor.*

**Keywords:** Melatonin. Neoplasia. Pnealectomy

## INTRODUÇÃO

O interesse na obtenção de conhecimentos mais específicos sobre tumores de mama na espécie canina vem crescendo devido ao aumento na frequência de ocorrência desse tipo de neoplasia subjacente ao diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (CAVALCANTI; CASSALI, 2006). Nesta espécie, configura-se como o segundo tipo de ocorrência mais observado, excedido apenas pelas neoplasias cutâneas. No entanto, quando consideradas somente as fêmeas, apresenta-se como a maior ocorrência (DE NARDI *et al.*, 2002).

A observação de que o crescimento das neoplasias mamárias pode ser regulado pelos estrógenos tem sido considerado um importante fator na abordagem terapêutica desse grupo de tumores (COTE; TAYLOR, 1994). Entretanto, evidências sugerem que a melatonina tem atributos para ser considerada um **fármaco antiestrogênico, podendo controlar a produção de hormônios gonadais, levando a um efeito inibitório sobre tumores hormônio-dependentes**, limitando assim, o potencial metastático de células tumorais (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

Um mecanismo proposto para a ação oncostática da melatonina no tumor de mama é a inibição do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), dificultando assim a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e foliculo estimulante (FSH) e, conseqüentemente, reduzindo a produção ovariana de estradiol. Dessa forma, ocorre a redução da resposta mitogênica do tumor ao estradiol, o que pode explicar os efeitos protetores do hormônio neste tipo de vetor patológico (SCALDAFERRI;

SOUSA-NETO, 2005). Deve-se também mencionar que a melatonina possui a capacidade de sequestrar diferentes tipos de radicais livres, como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (-OH), peroxila (LOO-) além do ânion peroxinitrilo (ONOO-); podendo também estimular a síntese de diferentes sistemas enzimáticos, como a superoxidodismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPX) e outras enzimas associadas à síntese da glutatona (SRINIVASAN, 2002). Considerando-se que o processo de desenvolvimento neoplásico contribui para o aumento de radicais livres no hospedeiro, pode-se acreditar que a melatonina pode desempenhar um importante efeito protetor no organismo.

Em virtude de similaridades biológicas com as neoplasias mamárias caninas, tumores experimentais transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, tem sido despertado o interesse de pesquisadores para empregá-los como modelo de abordagem. A vantagem de estudar o tumor de Ehrlich está no conhecimento prévio da quantidade de informação disponível, e da facilidade de manipulação quanto às condições do implante, além do desenvolvimento rápido da neoplasia, que permite a obtenção de resultados confiáveis em tempo reduzido (PALERMO-NETO *et al.*, 2003).

É possível que em animais portadores do tumor de Ehrlich, pinealectomizados, ocorram transformações significativas nos mecanismos de desenvolvimento desta neoplasia, correlacionados à presença de melatonina exógena. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de Ehrlich em camundongos *Mus musculus*, Swiss, fêmeas, considerando-se as modificações morfológicas associadas ao aparelho reprodutor.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA / UFRPE), sendo autorizado sob o número 147/2014.

Os experimentos foram realizados entre os meses de fevereiro e agosto. Foram utilizados 56 camundongos **fêmeas** Swiss (*Mus musculus*) de 60 dias de idade ( $30 \pm 2g$ ), provenientes do Biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, alojadas em caixas padronizadas para a espécie (41x34x16 cm). Os animais foram alimentados com **água e ração *ad libitum***, sendo mantidos sob um programa de luz contínua, com ciclos de 12h/dia, considerando o período de luz das 6:00 às

PEREIRA, Danielle Dutra *et al.* Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de *Ehrlich* implantado em camundongos swiss. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

18:00 horas, utilizando lâmpada fluorescente, luz do dia, de 40 W. A temperatura média da sala foi ajustada para  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Os camundongos foram distribuídos em delineamento de blocos inteiramente casualizados (DBC), sete tratamentos e oito animais por unidade experimental (Tabela 1). A pinealectomia foi realizada segundo o método preconizado por Maganhin *et al.* (2009b). A glândula pineal, depois de retirada, foi fixada em líquido de BOUIN e processada para inclusão histológica em parafina para confirmação à microscopia de luz. Para eliminar falsos resultados devido ao ato cirúrgico, o mesmo procedimento foi realizado nos animais do grupo Sham, mas sem a retirada da glândula pineal.

A melatonina foi administrada durante 60 dias antes da implantação do tumor e 12 dias após o implante tumoral, na dose de  $2\mu\text{g/g}$  de peso corporal, entre 18h00 e 19h00 (Prata-Lima *et al.* 2004), por via subcutânea. A melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis, Mo., USA) foi dissolvida em 0,1ml de NaCl a 0,9%, contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu inoculações diárias de 0,1ml do veículo por via subcutânea (REDINS *et al.*, 2000).

Os tumores foram obtidos a partir de matrizes doadoras, após os devidos procedimentos de eutanásia com aprofundamento anestesiológico mediante a associação cetamina e xilazina, na dose de 100 mg/kg ip cada (SANTOS *et al.*, 2006). Amostras do tumor foram obtidas e posteriormente fragmentadas até o volume de  $1\text{ cm}^3$ , mantidas em solução de Ringer mamífero pH 7,4 mais 20.000 U de penicilina G potássica, temperatura de  $18^\circ\text{C}$ .

Tabela 1 - Tratamento dos grupos experimentais

<i>Tratamento</i>	<i>Pinealectomizados</i>	<i>Sham-pinealectomizados</i>
Melatonina	A	B
Sem tratamento	C	D
Veículo da melatonina	E	F
Controle	G	

Os animais receptores, após os devidos procedimentos anestesiológicos com xilazina (14 mg/kg ip) e cetamina (70 mg/kg ip), recebiam subcutaneamente o fragmento de tumor de  $1\text{ cm}^3$  na região axilar direita. Após o período de quatro dias, a variação de volume do tumor foi acompanhada diariamente, obtendo-se as medidas de diâmetro correspondente, com auxílio de paquímetro. O volume do tumor foi obtido pela fórmula  $V = 4/3 \cdot \pi \cdot (R_1 \cdot R_2 \cdot R_3)$ , onde R1, R2 e R3 são os raios do tumor (Boursot *et al.* 2009). O percentual de inibição tumoral foi calculado no 12º dia após a inoculação do tumor,

segundo a equação  $% I = [(C - T)/C] \times 100$  proposta por Sousa *et al.* (2010), em que C = peso médio dos tumores dos grupos controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados.

A taxa de sobrevida foi estimada considerando-se o período de observação dos animais tumorados e a ocorrência de óbitos nos diferentes grupos, segundo metodologia proposta em Qureshi *et al.* (2001).

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanaziados mediante aprofundamento anestésico (SANTOS *et al.*, 2006), providenciando-se em seguida, a coleta de material biológico, tais como ovários e tumores. Esse material foi fixado e processado conforme os procedimentos de rotina para inclusão em resina histológica, obedecendo-se os protocolos disponíveis nos Laboratórios de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e Laboratório de Microscopia do Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O material devidamente processado foi posteriormente cortado em micrótomo ajustado para 1µm, sendo os cortes histológicos corados pela técnica da Hematoxilina/Floxina e avaliados em microscópio de luz.

Na avaliação histopatológica do tumor levou-se em consideração a observação de atividade mitótica, pontos de necrose, infiltrados inflamatórios, índice apoptótico, presença de células gigantes, pleomorfismo nuclear e áreas com edema.

A avaliação quantitativa dos folículos, corpo lúteo e vasos sanguíneos dos ovários foi realizada utilizando uma objetiva de 10X, e uma ocular de 10X contendo internamente um retículo de Weibel (WEIBEL, 1966), em que contou-se seis campos aleatórios e em sentido horário, considerando-se 100 pontos por campo, totalizando 600 pontos.

Os dados foram expressos em termos de média e desvio padrão e, quando necessário, em termos percentuais. A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos ( $p > 10\%$ ); e para a distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância, com o teste *post-hoc* de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn. Para avaliação das diferenças dos valores médios obtidos, considerou-se o nível descritivo equivalente a um valor de  $p < 0,05$ .

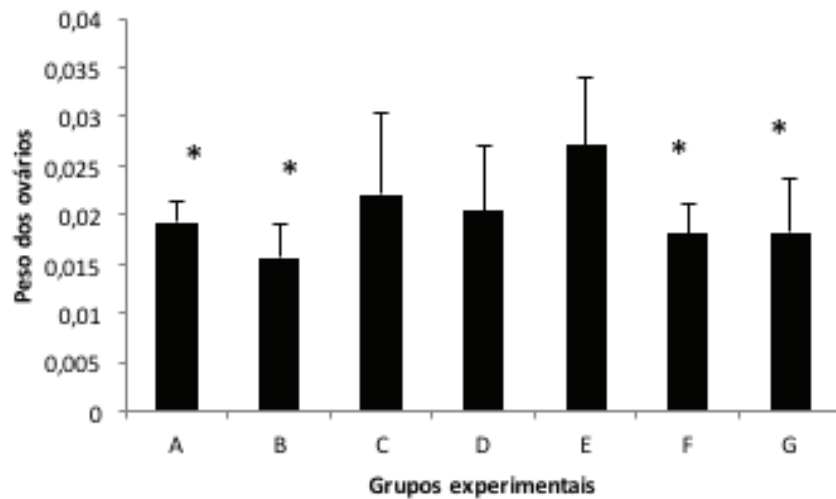
## RESULTADOS

Como principais resultados, observou-se inicialmente que o peso médio dos ovários dos diferentes grupos experimentais variou de forma significativa, conforme mostra a Figura 1.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.



Pode-se observar que os valores médios referentes à massa dos ovários dos animais dos grupos pinealectomizados (A, C e E) foi maior do que a massa dos ovários dos animais dos grupos sham-pinealectomizados (B, D e F), sendo os valores no grupo E estatisticamente significativo em relação aos grupos A ( $p < 0,05$ ), B ( $p < 0,001$ ), F ( $p < 0,01$ ) e G ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Houve também uma redução importante no peso médio dos ovários dos animais do grupo pinealectomizado tratado com melatonina (A) em relação aos animais dos demais grupos pinealectomizados (C e E), e os animais do grupo sham-pinealectomizados tratados com melatonina (B) quando comparados aos animais dos outros grupos sham-pinealectomizados (D e F).



**Figura 1** - Peso médio e desvio-padrão dos ovários dos animais nos grupos experimentais. \* Diferença significativa em relação ao grupo E. A- Pinealectomizado tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.

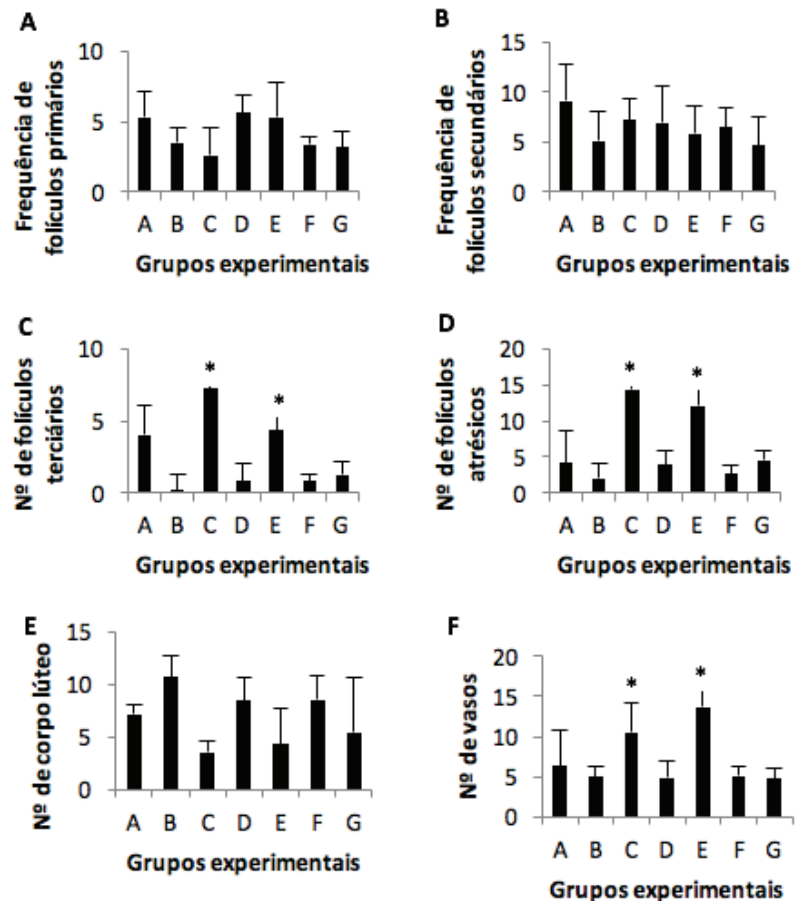
A figura 2 apresenta o número de folículos primários, folículos secundários, folículos terciários, folículos atresícos, corpos lúteos e vasos sanguíneos observados nos ovários dos animais nos grupos experimentais. Pode-se observar que o grupo E apresentou uma maior frequência de folículos terciários quando comparado ao grupo B ( $p < 0,01$ ), D ( $p < 0,01$ ), F ( $p < 0,01$ ) e G ( $p < 0,05$ ). Já o grupo C exibiu maior frequência que A ( $p < 0,05$ ), B ( $p < 0,001$ ), D ( $p < 0,001$ ), F ( $p < 0,001$ ) e G ( $p < 0,001$ ). O grupo A mostrou uma média maior que B ( $p < 0,01$ ), D ( $p < 0,05$ ) e F ( $p < 0,05$ ), conforme os dados assinalados na figura 2C.

Se tratando de folículo atresico, o grupo E apresentou média maior que A ( $p < 0,01$ ), B ( $p < 0,001$ ), D ( $p < 0,001$ ), F ( $p < 0,001$ ), e G ( $p < 0,001$ ), e o grupo C apresentou maior frequência que A ( $p < 0,001$ ), D ( $p < 0,001$ ), F ( $p < 0,001$ ), e G ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2D). Quando se observou a frequência de corpo lúteo, o grupo B apresentou maior quantidade quando comparado ao grupo C ( $p < 0,01$ ) e E ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2E). O número de vasos foi visto em maior quantidade no grupo E quando comparado ao grupo A ( $p < 0,01$ ), B ( $p < 0,001$ ), D ( $p < 0,001$ ), F ( $p < 0,001$ ) e G ( $p < 0,001$ ). O grupo C também apresentou uma frequência maior que o grupo B ( $p < 0,05$ ), D ( $p < 0,05$ ), F ( $p < 0,05$ ) e G ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2F).

A figura 3 mostra a região cortical dos ovários dos animais dos diferentes grupos experimentais. Observar folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento, com predominância de folículos terciários, além de alguns corpos lúteos, nos grupos pinealectomizados (Fig. 3A, C e E). Houve uma redução significativa no número de folículos terciários e folículos atresicos nos grupos sham-pinealectomizados quando comparados aos pinealectomizados, além de grande predominância de corpos lúteos (Fig. 3B, D e F). O número de corpo lúteo mostrou-se ainda maior no grupo B, no qual os animais além de produzirem espontaneamente melatonina endógena, receberam aplicação exógena.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.





**Figura 2** - Número de folículos primários, secundários, terciários e atrésicos, corpo lúteo e vasos sanguíneos nos ovários dos animais nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. \* Diferença significativa em relação ao grupo G.

O desenvolvimento tumoral ocorreu de forma característica conforme o tipo de tratamento empregado, como se pode visualizar na figura 4. Os parâmetros de regressão logarítmica das funções que descrevem a variação de volume do tumor em função do tempo podem ser observados na tabela 2. Nesta tabela, pode-se verificar que todos os coeficientes angulares foram negativos, caracterizando funções crescentes, com coeficientes de determinação  $R^2 > 0,8$ , indicando que as funções matemáticas obtidas são razoáveis para a descrição da variação temporal de crescimento do tumor de Ehrlich. A razão obtida entre os coeficientes angulares dos diferentes grupos de tratamento em relação ao grupo controle

revelou que em alguns grupos (C e E) a taxa de crescimento foi maior, para um valor de  $p < 0,05$ .

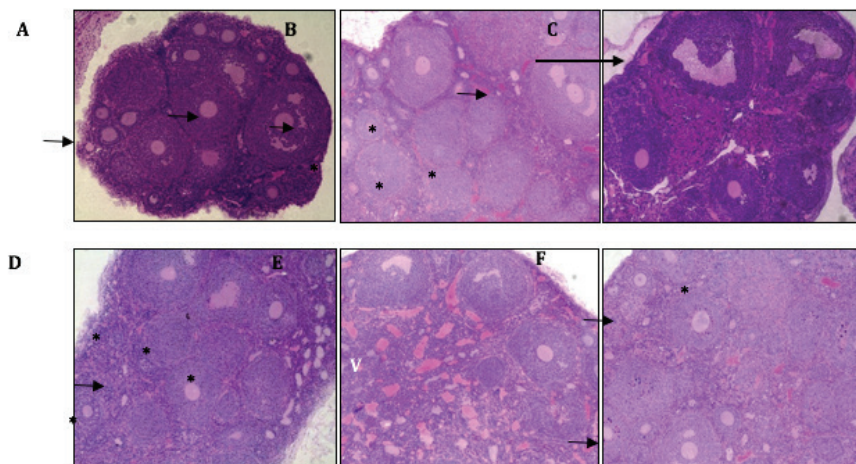


Figura 3 - Fotomicrografia de ovário de camundongos fêmeas nos grupos experimentais: A- Pinelectomizado tratado com melatonina. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas). B- Sham-pinelectomizado tratado com melatonina. Diversos corpos lúteos (\*) e folículos (setas). C- Pinelectomizado sem tratamento. Presença de folículos atrésicos (seta longa). D- Sham-pinelectomizado sem tratamento. Presença de corpos lúteos (\*) e folículos (setas). E- Pinelectomizado tratado com o veículo da melatonina. Região medular bastante desenvolvida com presença de inúmeros vasos sanguíneos (V). F- Sham-pinelectomizado tratado com o veículo da melatonina. Presença de corpo lúteo (\*) e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas). Hematoxilina-Floxina: 100X.

Na tabela 3, observa-se que no 5º dia pós-transplante os animais do grupo B apresentaram a menor taxa de crescimento tumoral em relação aos demais grupos, fato também observado para os animais do mesmo grupo no 12º dia. Ainda nesta tabela, observou-se que os animais pinelectomizados tratados com melatonina apresentaram uma taxa de crescimento tumoral inferior à encontrada para os animais dos grupos C, pinelectomizados sem tratamento e para os animais do grupo E, pinelectomizados tratados com veículo da melatonina, para um valor de  $p < 0,05$ . É interessante assinalar que os animais dos grupos C e E apresentaram uma taxa de crescimento tumoral significativa em relação à taxa obtida para os animais do grupo controle. Em linhas gerais, ainda na tabela 3, verificou-se que todos os animais, de todos os grupos apresentaram um aumento na taxa de crescimento tumoral no 12º dia em relação ao 5º dia, sendo que, em alguns grupos, este crescimento apresentou-se menor, como pode ser visualizado na

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

coluna das diferenças entre as taxas. Curiosamente, os animais do grupo B apresentaram a menor razão entre as taxas de crescimento em relação aos animais dos demais grupos.

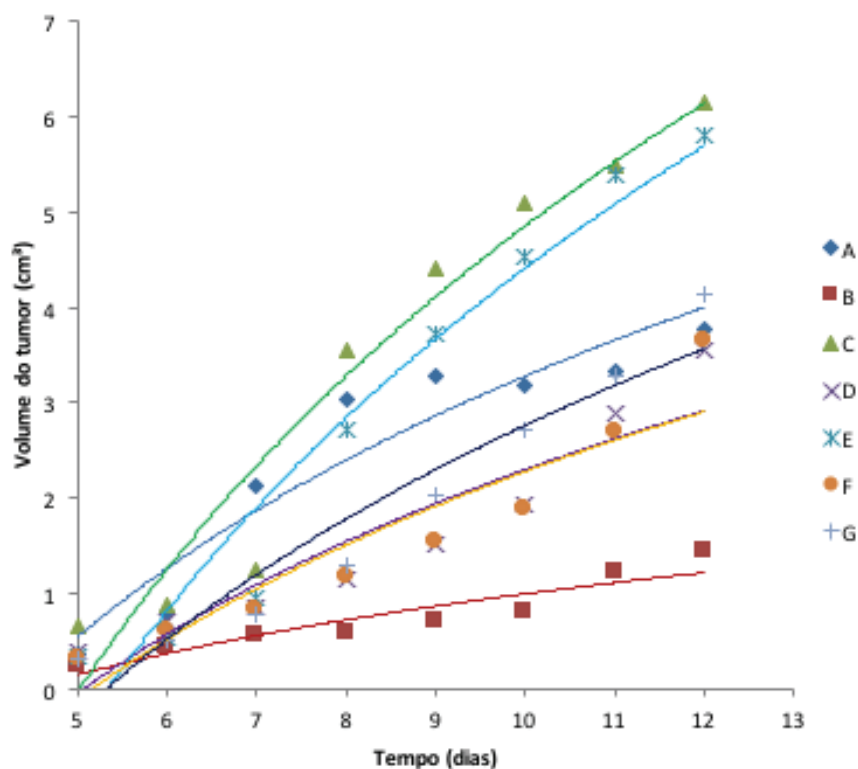


Figura 4 - Evolução do crescimento tumoral do 5º ao 12º dia após o implante do tumor. A- Pinelectomizado tratado com melatonina. B- Sham-pinelectomizado tratado com melatonina. C- Pinelectomizado sem tratamento.

D- Sham-pinelectomizado sem tratamento. E- Pinelectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinelectomizado tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.

Os dados referentes ao percentual de inibição tumoral podem ser visualizados na figura 5. Nesta figura, verificou-se que os tumores dos animais dos grupos A (%I= 45,9 ± 31,3 %) e B (%I= 55,7 ± 35,02 %) apresentaram um percentual de inibição superior em relação ao grupo controle, para um valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 2 - Parâmetros de regressão logarítmica das funções que descrevem a variação média de volume ao longo do tempo do tumor de Ehrlich nos diferentes grupos de tratamento. Razão entre o coeficiente angular de cada grupo em relação ao grupo controle.

Grupos experimentais	Coeficiente linear (b)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	Razão
A	-5,81 ± (-)1,52	3,95 ± 0,82	0,90	0,90 ± 0,30
B	-1,82 ± (-)1,34	1,23 ± 0,78	0,86	0,28 ± 0,67
C	-11,39 ± (-)2,57	7,05 ± 1,59	0,94	1,0 ± 0,31 *
D	-5,49 ± (-)3,35 3,39 ± 1,95		0,86	0,77 ± 0,62
E	-11,79 ± (-)2,30	7,04 ± 1,27	0,95	1,60 ± 0,28 *
F	-5,66 ± (-)1,09	3,45 ± 0,72	0,87	0,78 ± 0,30
G	-7,35 ± (-)1,51	4,4 ± 0,96	0,91	1 ± 0

A- Pinealectomizado tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. G- Controle. \* Diferença significativa (p<0,05), teste T de Student, respectivamente T=2,144 e T=2,367 (gl=8), T tabelado=1,96.

A análise histológica dos tumores dos animais dos grupos experimentais (Fig. 6) revelou a presença de células neoplásicas pleomórficas, com núcleos bastante volumosos, alterando-se a relação núcleo-citoplasma, com intenso grau de hiper cromasia e nucléolos proeminentes (Fig. 6D). Células gigantes multinucleadas e figuras mitóticas apresentaram-se muito frequentes (Fig. 6D). Também se verificou a ocorrência de extensas áreas de necrose de coagulação (Fig. 6B), com células mostrando o citoplasma mais eosinofílico, refletindo perda da basofilia e aumento da afinidade das proteínas citoplasmáticas pela eosina, com núcleos picnóticos e às vezes com acentuado grau de cariorrexe.

PEREIRA, Danielle Dutra *et al.* Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de *Ehrlich* implantado em camundongos swiss. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
 Dutra *et al.* Atividade  
 antitumoral da  
 melatonina sobre  
 o tumor de *Ehrlich*  
 implantado em  
 camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
 n. 4, p. 911-938, 2019.

Tabela 3 - Taxa de variação infinitesimal do volume do tumor em função do tempo (cm<sup>3</sup>/dia).

Grupo	5º dia	12º dia	Diferença entre as taxas
<b>A</b>	0,90 ± 0,30	4,00 ± 0,51	3,10 ± 0,97
<b>B</b>	0,28 ± 0,67	1,23 ± 0,59	0,95 ± 0,98
<b>C</b>	1,60 ± 0,31	6,13 ± 1,37	4,53 ± 2,09
<b>D</b>	0,77 ± 0,62	2,93 ± 1,50	2,16 ± 2,46
<b>E</b>	1,60 ± 0,28	5,71 ± 0,85	4,11 ± 1,53
<b>F</b>	0,78 ± 0,30	2,91 ± 0,71	2,13 ± 1,01
<b>G</b>	1,00 ± 0,00	3,58 ± 0,88	2,57 ± 1,30

Pinealectomizado tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.

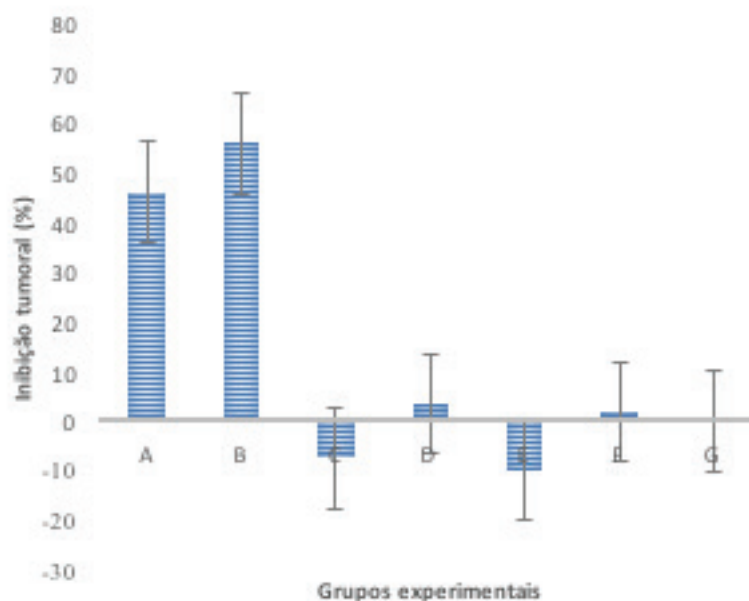


Figura 5 - Percentual de inibição do crescimento do tumor de Ehrlich. A- Pinealectomizado tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina.

No geral, os tumores dos animais dos grupos experimentais apresentam um padrão histológico similar ao que foi observado no grupo controle, entretanto figuras de mitose se apresentaram

de maneira mais intensa nos animais pinealectomizados sem tratamento e nos animais tratados com veículo da melatonina (C e E, respectivamente). Em contrapartida, os animais que receberam melatonina apresentaram maior índice apoptótico. Os vasos tumorais dos grupos experimentais apresentaram uma organização caótica, com diâmetros variados, exibindo forma tortuosa.

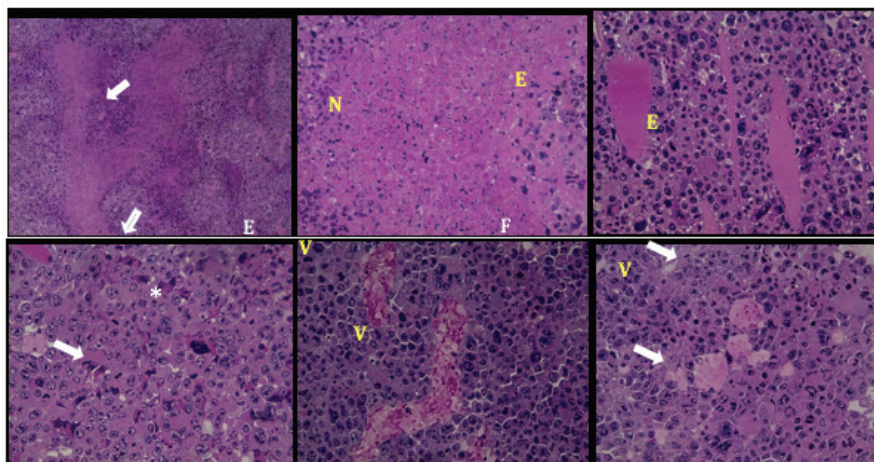


Figura 6 - Fotomicrografia do Tumor de Ehrlich. A- Extensa área de necrose (seta). B- Presença de necrose (N). C- Área com edema (E). D- Células em mitose (setas) e células gigantes com núcleos proeminentes (\*). E- Presença de vasos sanguíneos (V). F- Vasos sanguíneos (V) e células em apoptose (setas).  
Fig. A: 100X; Fig. (B, C, D, E e F): 400X. Hematoxilina-Floxina.

Na Figura 7, pode-se comparar a sobrevida cumulativa dos animais dos grupos experimentais em função do tempo de experimento. Não há representação dos grupos A e B, pois os mesmos apresentaram sobrevida cumulativa semelhante ao grupo controle. A sobrevida cumulativa no grupo C foi de 88% no 7º dia e de 75% do 9º ao 12º dia. No grupo D, a sobrevida cumulativa foi de 75% no 12º dia e no grupo E foi de 75% no 10º dia. A sobrevida cumulativa foi de 88% no 11º dia para o grupo F. Apesar dos animais pinealectomizados apresentarem uma redução no tempo de sobrevida, quando comparado ao demais grupos, foi observado através do teste de log-rank, a não ocorrência de diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.



PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

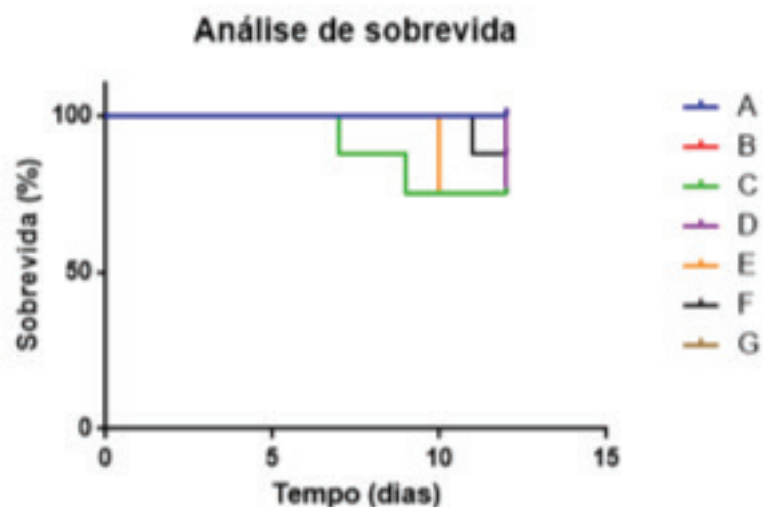


Figura 7 - Sobrevida cumulativa dos animais nos grupos experimentais após o implante do tumor. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.

## DISCUSSÃO

Dentro das condições de realização experimental, foi possível observar a redução no peso dos ovários dos animais dos grupos tratados com melatonina, o que corrobora os achados de Prata-Lima *et al.* (2004). Esses autores verificaram que ratos com apenas um ovário, tratados com melatonina por quatro meses consecutivos, mais exposição à luz contínua durante oito meses, apresentavam redução significativa dos ovários remanescentes. Atribuíram esses efeitos à provável ação anti-gonadotrófica da melatonina sobre o hipotálamo anterior desses animais. É possível que nos nossos experimentos tenha ocorrido algo similar em decorrência da administração de melatonina em animais pinealectomizados. Resultados parecidos também foram encontrados em Chuffa *et al.* (2011), que relataram uma redução do peso dos ovários em ratas não pinealectomizadas, que receberam 1µg/g PV de melatonina durante 60 dias consecutivos. Alguns autores parecem associar as alterações metabólicas do tecido ovariano com mudanças na expressão dos receptores para melatonina neste tipo de tecido (SIROTKIN; SCHAEFFER, 1997, TAMURA *et*



*al.*, 2009), sugerindo uma importante participação da melatonina na modulação de fatores que regulam os mecanismos do sistema genital (MAGANHIN *et al.*, 2009a).

Um outro aspecto importante é que sendo a melatonina um produto derivado da via metabólica do triptofano associada aos compostos do tipo metoxi-indol, estes parecem atenuarem ações protagonizadas pelas vias glutamatérgicas, especialmente a atividade da óxido nítrico sintase - NOS, responsável pela produção do óxido nítrico, como fazem também os metabólitos derivados da via das quinureninas, associada também à metabolização do triptofano. Por sua vez o óxido nítrico, de forma autócrina e parácrina, estimula a liberação de glutamato e de melatonina, envolvendo a participação de mediadores integrados à função das mitocôndrias, cuja atividade pode ser modulada pelos níveis de estresse oxidativo local (CASTROVIEJO *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2013).

Basicamente três formas de NOS foram descritas, sendo uma induzida iNOS e duas constitutivas cNOS, sendo a eNOS endotelial e a nNOS neuronal. Estas formas constitutivas parecem ser dependentes de íons de cálcio e calmodulina, participando nos eventos de sinalização celular. Já a iNOS é produzida por macrófagos e outros tipos celulares ativados por citocinas (PIRES, 2009, DIAS *et al.*, 2011).

Pallares *et al.* (2008) verificaram que camundongos *knockout-NOS-3* (eNOS), apresentavam deficiências importantes em processos como ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário. Na verdade, as iNOS e eNOS podem ser encontradas no tecido ovariano, mais especificamente nas células luteínicas e endoteliais, aumentando a expressão durante a fase luteal e redução na fase de regressão lútea, podendo o óxido nítrico participar na foliculogênese, atresia, esteroidogênese, biossíntese de prostaglandinas, ovulação, luteólise e maturação de oócitos (SHIRASUNA *et al.*, 2010, PANCARCI *et al.*, 2012).

Folículos menores parecem produzir mais óxido nítrico em relação aos maiores, indicando que a atividade NOS varia durante o desenvolvimento folicular. Os folículos subordinados parecem ter concentrações de óxido nítrico maiores e taxas de Prostaglandinas PGE2 e PGF2 $\alpha$  menores em relação aos folículos dominantes (PANCARCI *et al.*, 2011). Assim, o papel do óxido nítrico será dependente do estágio do ciclo estral, podendo assumir uma condição luteolítica ou luteotrófica (SHIRASUNA *et al.*, 2010).

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que animais sham-pinelectomizados que recebiam o veículo da melatonina, como também os animais do grupo controle, apresentaram, em ambos os

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

grupos, uma redução significativa do peso dos ovários em relação aos animais pinealectomizados sem tratamento com melatonina; bem provavelmente, em decorrência dos níveis endógenos espontâneos de melatonina nesses animais. Já nos animais pertencentes ao grupo sham-pinealectomizado sem tratamento com melatonina, não foi observada redução dos ovários, talvez devido a eventuais baixos níveis de melatonina, protagonizados pela ocorrência de uma relação de dominância não resolvida dentro do grupo experimental, ou ainda problemas relacionados à sincronização dos ritmos circadianos neste grupo experimental; uma vez que a produção de melatonina na glândula pineal, por exemplo, acompanha as variações de atividade do sistema enzimático coordenado pela N-acetiltransferase devendo estar aumentada no período noturno (ARENDDT, 2005).

Um elevado número de corpo lúteo foi encontrado nos animais sham-pinealectomizados tratados com melatonina, resultado que está de acordo com os dados encontrados por Smith *et al.* (1975). A partir da interpretação de seus estudos, relataram que a formação do corpo lúteo, normalmente, alcança sua máxima expressão na fase de diestro, quando há um decréscimo nos níveis de estrógeno. Aumento na frequência de ocorrência do corpo lúteo correlacionado com o aumento dos níveis de melatonina também foi destacado por Santos *et al.* (2006), cujos resultados reiteraram a ação anti-gonadotrófica da melatonina, destacando o seu afetamento sobre o trem de pulsos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), e por sua vez, a liberação de hormônios gonadotróficos (FSH e LH), e conseqüente produção de **estrógeno e progesterona** no tecido ovariano (ADASHI, 1991).

Sabe-se que os estrógenos podem regular diretamente a foliculogênese ovariana assim como a formação do corpo lúteo, além do aumento da expressão de receptores para gonadotrofinas nas células da granulosa, a apoptose das células da granulosa e a produção de esteróides pelas células da teca, da granulosa e luteais (SOUZA *et al.*, 2008). Estas podem estar associada às ações do óxido nítrico, que juntamente com as concentrações de estrógeno e prostaglandina do tipo PGF 2 $\alpha$ , define a qualidade da dinâmica folicular (PANCARCI *et al.*, 2012).

Em alguns ovários dos grupos pinealectomizados, observou-se uma extensa área vascularizada. Isto se deve à reorganização dos capilares sanguíneos, a fim de suprir as necessidades teciduais durante as fases de crescimento e atresia folicular, segundo Barboni *et al.* (2000). As gonadotrofinas apresentam um papel crucial na vascularização ovariana, influenciando a produção do fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF), principal fator angiogênico

(FERRARA *et al.*, 1992); muito embora as alterações no fluxo sanguíneo folicular tenham relação também com as variações no nível de óxido nítrico local (PANCARCI *et al.*, 2011).

Com relação ao crescimento do tumor de Ehrlich, considerando-se que este pode ser descrito por uma equação do tipo  $y = a \cdot \ln x + b$ , em que “y” é o volume de tumor, “a” o coeficiente angular, “x” o tempo e “b” o coeficiente linear, verificou-se, em todos os tratamentos, que a taxa infinitesimal de variação do volume tumoral era dependente do tempo, uma vez que a derivada primeira da função acima é do tipo  $y' = a/x$ . De certa forma, isto significa que o tecido tumoral apresenta dinâmicas de crescimento diferentes conforme o tumor se desenvolve. Assim, para um mesmo intervalo temporal, pode-se comparar o coeficiente angular das respectivas expressões obtidas e assim se ter uma ideia da rapidez com que o tumor de Ehrlich se desenvolveu em cada grupo de tratamento. Este é um parâmetro genuinamente associado à forma como cada tipo de tumor estabelece a sua relação com a matriz extracelular, considerando-se toda a complexidade envolvida no jogo de sinalizações trocadas entre o tumor e os diferentes tipos celulares que perfazem cada tipo de tecido.

A razão entre os coeficientes angulares, assim como a diferença entre as taxas infinitesimais de crescimento tumoral obtidas para dois momentos temporais distintos, permitiu verificar que o tratamento com melatonina de animais não pinealectomizados, na dose de 2µg/g, parece ter surtido importante efeito sobre o metabolismo das células tumorais, em especial os mecanismos reguladores da multiplicação celular. Este resultado também foi observado por Srinivasan *et al.* (2008), que assinala o papel da melatonina de gerar um efeito antiproliferativo sobre **células cancerígenas**. O fato de animais pinealectomizados tratados com melatonina apresentarem uma taxa de crescimento tumoral inferior à de animais pinealectomizados sem tratamento e tratados com veículo da melatonina, de certa forma reforça a ideia de que a presença da melatonina pode realmente afetar os mecanismos associados à multiplicação das células tumorais. Aqui, também é importante destacar que a presença de melatonina parece proteger os tecidos contra danos oxidativos induzidos por radicais livres, geralmente liberados em grande profusão ao longo do desenvolvimento de neoplasias, promovendo um aumento na disponibilidade de sistemas enzimáticos que exercem ações antioxidantes, especialmente, a redução dos níveis de peroxidação lipídica (ANTOLÍN *et al.*, 1996, REITER *et al.*, 2000, KERMAN *et al.*, 2005, AKCAY *et al.*, 2005).

Destacamos que, curiosamente, ocorreu um aumento na taxa de crescimento do tumor de Ehrlich nos animais dos grupos C e E em

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

relação aos animais do grupo controle, provavelmente devido a uma potencialização das respostas protagonizadas pela pinealectomia, favorecidas, em decorrência da presença de álcool etílico, que pode atuar como eluente facilitador quanto ao acesso aos domínios intracelulares, amplificando sinais moleculares importantes para o desenvolvimento tumoral. Também se deve considerar que a retirada da pineal tem consequências importantes sobre os sistemas temporizadores endógenos, afetando padrões de sinalização da matriz extracelular, que por sua vez podem estimular um aumento na taxa de divisão celular, como também de diferenciação, favorecendo o desenvolvimento de tecidos tumorais (MENNA-BARRETO; WEY 2007; RANG *et al.*, 2007).

Seja como for, considerando-se a origem inicial do tumor de Ehrlich, oriundo de tecido mamário, pode-se também admitir que a melatonina possa suprimir a proliferação de células cancerígenas induzidas por estrógeno, assim como se observa em células de câncer de mama humano (HILL; BLASK, 1988). Deve-se, entretanto, observar que o óxido nítrico pode também assumir importante papel nos mecanismos de neovascularização tumoral (BUTTERY *et al.*, 1993), se considerarmos a sua importância como mediador nos mecanismos de defesa do organismo contra infecções, inflamações e neoplasias; lembrando que a sensibilidade de cada célula ao óxido nítrico pode variar conforme a sua condição metabólica (MONCADA *et al.*, 1991).

Macrófagos residentes podem também produzir o óxido nítrico mediado pelas iNOS, sendo que este difunde-se para o exterior, invadindo diferentes tipos celulares e destruindo-os, através da inibição de centros enzimáticos do tipo Fe-S, geralmente associadas aos mecanismos da respiração celular. Por outro lado, há evidências de que o óxido nítrico pode participar como agente de inicialização da carcinogênese, principalmente quando as células apresentam deficiências em produzir óxido nítrico. Este fato, associando-se à presença de certos fatores potencializadores, pode proporcionar um descontrole na citoestase e sobre os mecanismos de diferenciação celular, favorecendo a propagação de clones celulares malignos (WINK *et al.*, 1998).

Assim, várias explicações poderiam ser aventadas para esclarecer esta diferença de comportamento do tumor entre os animais nos diferentes grupos. Uma interessante é a de que estas variações podem estar associadas a diferenças na constituição do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), uma vez que os camundongos utilizados neste trabalho não eram isogênicos. Ashewell *et al.* (1994)

assinala a diferença de desenvolvimento de tumores em camundongos não isogênicos.

Considerando-se, enfim, apenas a massa do tumor na etapa final da experimentação com os diferentes grupos de tratamento, verificou-se que o percentual de inibição tumoral obtido para os animais dos grupos A e B, que recebiam o suprimento de melatonina, foi bastante expressivo em relação ao grupo controle, ratificando o papel da melatonina no processo de inibição tumoral. Aqui, é importante esclarecer que a inibição tumoral avaliada desta forma, não considera a maneira como o tumor se desenvolveu ao longo de um processo, assinalando a contribuição da população de células tumorais num determinado momento sobre a dinâmica de crescimento como um todo, bem como a sua relação com o contexto bioquímico do hospedeiro. A massa final do tumor retrata mais o resultado macroscópico de uma relação entre tumor e hospedeiro que se desenvolve na medida em que o tumor cresce num determinado contexto tecidual, em que o acesso aos recursos nutricionais nem sempre é facilmente obtido. Assim, um tumor de rápido crescimento se autolimita por não ter muitas vezes uma rede circulatória favorável que lhe permita tirar os recursos necessários para o seu desenvolvimento.

Seja como for, os dados referentes ao crescimento tumoral estão de acordo com os resultados apresentados na morfometria e morfologia do ovário, onde os animais pinealectomizados geralmente apresentavam modificações na estrutura do ovário devido ao aumento no nível de estrógeno e, por conseguinte, foram aqueles que apresentaram maior crescimento tumoral. Em contrapartida, a administração de melatonina, contribuindo para a redução do nível de estrógeno, favoreceu a inibição do crescimento dos tumores.

Histologicamente, a observação de áreas de necrose no tumor justifica-se devido ao rápido crescimento, o que dificulta a vascularização no interior da massa tumoral. Esses achados são semelhantes aos estudos realizados por Belo *et al.* (2004). O elevado número de mitose observado nos grupos pinealectomizados, deve-se à diminuição da melatonina e consequente aumento de estrógeno, cuja função é a indução de mitoses em células iniciadas (LEE; LEE, 2001). Em contrapartida, o elevado número de apoptose em animais que receberam melatonina corrobora os estudos realizados por Sainz *et al.* (2005).

Há evidências de que o estrógeno interfere na expressão do gene *bcl-2*, que controla o processo de apoptose via mitocôndria (SUH, 2003). Associado ao processo apoptótico, também se tem

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

a participação do óxido nítrico, estimulado pela participação de proteínas pró-apoptóticas, como Fas, bax e caspases; mobilização do cálcio intracelular (FAES *et al.*, 2007); e presença de moléculas como as citocinas TNF- $\alpha$ , interferon  $\gamma$  e endotelina (SKARZYNSKI *et al.*, 2008).

De certa forma, a morte celular mediada por óxido nítrico pode ocorrer tanto por necrose como por apoptose. Os processos apoptóticos parecem ser dependentes de cGMP, enquanto a necrose não (TAIMOR *et al.*, 2000). Há evidências de que o óxido nítrico induz apoptose em diferentes linhagens e tipos celulares (ALBINA *et al.*, 1989); porém, evidências também existem assinalando que a apoptose em linhagens celulares de rápido crescimento e diferenciação parecem não estar mediadas pelo óxido nítrico (KRÖNCHE *et al.*, 1997). De qualquer forma, células de sarcomas, mastocitomas e melanomas sofrem apoptose em grande intensidade quando expostas ao óxido nítrico, enquanto outros tipos celulares não exibem o mesmo tipo de resultado (DIMMELER; ZEIHNER, 1997).

Evidências apontam que macrófagos de camundongos portadores de fibrossarcoma apresentavam aumento de síntese de óxido nítrico, que por sua vez afetava a proliferação de células tipo TCD4 (ALLEVA *et al.*, 1994). Assim como evidências apontam que o óxido nítrico produzido por tumores sólidos parece facilitar a permeabilidade vascular, contribuindo para o acesso nutricional, favorecendo o rápido crescimento do tumor (MAEDA; AKAIKE, 1998).

Disso tudo, verifica-se a complexidade, inerente aos processos de sinalização, que envolve a relação tumor/hospedeiro, tratando-se de um processo multifatorial, mas que pode ser seriamente afetado quando os mecanismos de sincronização temporal do metabolismo são perturbados, gerando circunstâncias fisiológicas críticas, que contribuem para o desenvolvimento do estado patológico.

Finalmente, a sobrevida cumulativa observada nos nossos achados corrobora os estudos realizados por Lissoni *et al.* (1992), nos quais pacientes com câncer de pulmão tratados com melatonina apresentaram tempo médio de sobrevida maior. Na maior parte dos ensaios combinados, em que a melatonina foi utilizada em conjunto com drogas terapêuticas, a presença da indolamina mostrou prolongar o tempo de progressão livre da doença e a sobrevida global, bem como amenizar o sofrimento do paciente (VIJAYALAXMI *et al.*, 2002).



## CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que a melatonina, através de sua atuação no ovário, interfere nos mecanismos regulatórios dos processos de crescimento do tumor de Ehrlich, apresentando ação inibitória e podendo propiciar um prolongamento na sobrevida dos pacientes. Em contrapartida, pode-se conjecturar que eventuais alterações nos padrões de ritmicidade endógena para a melatonina podem predispor os organismos a uma maior incidência de tumor, bem provavelmente em decorrência de alterações importantes nos mecanismos sinalizadores que dimensionam, por exemplo, os eventos que controlam as características físico-químicas da matriz extracelular. Por se tratar de um mecanismo complexo e multifatorial, espera-se que novos estudos pormenorizem os detalhes direta e indiretamente associados a estes mecanismos, oferecendo a oportunidade para o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias terapêuticas para que se controle ou erradique patologias como o câncer.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.



PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

## REFERÊNCIAS

ADASHI, E. Y. The ovarian life cycle, In: YEN, S.S.C.; JAFFE R.B. **Reproductive Endocrinology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. p. 202-204.

AKCAY, Y. D.; YALCIN, A.; SOZMEN, E. Y. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 10, p. 321-329, 2005.

ALBINA, J. E.; CALDWELL, M. D.; HENRY, W. L. J.; MILLS, C. D. Regulation of macrophage functions by L-arginine. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 169, p. 1021-1029, 1989.

ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor-induced regulation of supressor macrophage nitric oxide and TNF-a production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-b, prostaglandin E2. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 153, p. 1674-1686, 1994.

ANTOLÍN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SAÍNZ, R. M.; MAYO, J. C.; URÍA, H.; KOTLER, M. L.; RODRIGUEZ-COLUNGA, M. J.; TOLIVIA, M.; MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, p.882-890, 1996.

ARENDRT, J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. **Journal of Biological Rhythms**, Thousand Oaks, v. 20, n. 291-303, 2005.

ASHEWELL, J. P.; BERGER, N. A.; CIDROWSKI, J. A.; LANE, D. P. Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 15, p. 147-151, 1994.

BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MATTIOLI, M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. **Biology of Reproduction**, Champaing, v. 63, p. 858-864, 2000.

BELO, A. V.; BARCELO, L. S.; FERREIRA, M. A.; TEIXEIRA, M. M.; ANDRADE, S.P. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor mice. **Life Science**, Oxford, v. 14, p. 2827-2837, 2004.

BOURSOT, C.; LE BORGNE, A.; BARILLOT, I.; VENEL, Y.; MURET, A.; BAULIEU, J. L.; PRUNIER-AESCH, C. Segmentation

automatique du volume tumoral des cancers pulmonaires non à petites cellules sur la 18F-FDG TEP-TDM envue d'un traitement par radiothérapie. **Médecine Nucléaire**, Paris, v. 33, p. 440–449, 2009.

BUTTERY, L. D. K.; SPRINGALL, D. R.; ANDRADE, S. P.; RIVEROS-MORENO, V.; HART, I.; PIPER, P. J.; POLKA, J. M. Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumors in mice. **Journal Pathology**, London, v. 171, p. 311-319, 1993.

CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; CARAZO, A.; LEON, J.; KHALDY, H. Melatonin mitochondrial homeostasis and mitochondrial – related diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 2, p. 133-151, 2002.

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 61, p. 56-63, 2006.

COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. Immunohistochemical detection of steroid hormone receptors. In: **Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, Philadelphia, 1994.

CHUFFA, L. G. A.; AMORIM, J. P. A.; TEIXEIRA, G. R.; MENDES, L. O.; FIORUCI, B. A.; PINHEIRO, P. F. F.; SEIVA, F. R. F.; NOVELLI, E. L. B.; MELLO JUNIOR, W.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, p. 217-223, 2011.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidade de tratamentos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, p. 15-26, 2002.

DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 96, p. 68-75, 2011.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 1, p. 275-281, 1997.

FAES, R. F.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; ROSA-SILVA, A. A. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BARBOSA, J. C. Relationship

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de Ehrlich implantado em camundongos swiss. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

among nitric oxide, progesterone and estradiol-17 $\beta$  concentrations in follicular fluid during follicular development in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 4, p. 1-2, 2007.

FERRARA, N.; HOUCKK, J. L.; LEUNG, D. W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Review**, New York, v. 13, p. 18-32, 1992.

HILL, S. M.; BLASK, D. E. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. **Cancer Research**, Baltimore, v. 48, p. 6121-6126, 1988.

KERMAN, M.; CIRAK, B.; OZGUNER, M. F.; DAGTEKIN, A.; SUTCU, R.; ALTUNTAS, I.; DELIBAS, N. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? **Experimental Brain Research**, Berlin, v. 163, p. 406-410, 2005.

KRÖNCHE, K. D; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, hen, and where? **Nitric Oxide**, Orlando, v. 1, p. 107-20, 1997.

LEE, D. S.; LEE S.H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. **Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 501, p. 84-86, 2001.

LISSONI, P.; BARNI, S.; ARDIZZOIA, A.; PAOLOROSSO, F.; CRISPINO, S.; TANCINI, G.; TISI, E.; ARCHILI. Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced non small cell lung cancer resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. **Oncology**, Basel, v. 49, p. 336-339, 1992.

MAEDA, H.; AKAIKE, T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. **Biochemistry**, New York, v. 63, p. 854-865, 1998.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JÚNIOR, J. M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 54, p. 267-271, 2009a.

MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SIMÕES, M. J.; EVÊNCIO-NETO, J.; BARACAT, E. C.; SOARES JUNIOR, J. M. Rat pinealectomy: a modified direct visual approach. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 24, p. 321-324, 2009b.

MENNA-BARRETO, L.; WEY, D. Ontogênese do sistema de temporização – a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. **Psicologia USP**, São Paulo, v. 18, p. 133-153, 2007.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review**, Baltimore, v. 43, p. 109-142, 1991.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**, San Diego, v. 17, p. 43-54, 2003.

PALLARES, P.; GARCIA-FERNANDEZ, R. A.; CRIADO, L. M.; LETELIER C. A.; ESTEBAN, D.; FERNANDEZ-TORO, J. M.; FLORES, J. M.; GONZALEZ-BULNES, A. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo Survival in a knockout mouse model. **Reproduction**, Cambridge, v. 136, p. 573-5798, 2008.

PANCARCI, S. M.; ARI, U. C.; ATAKISI, O.; GUNGOR, O.; CIGREMIS, Y.; BOLLWEIN H. Nitric oxide concentrations, estradiol-17 $\beta$  progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 130, p. 1-2, 2012.

PANCARCI, S. M.; GUNGOR, O.; ÇIGREMIS, Y.; ARI, U. Ç.; BOLLWEIN, H. 2011. Changes in follicular blood flow and nitric oxide levels in follicular fluid during follicular deviation in cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 123, p. 149-156, 2011.

PIRES, P. R. L.; SANTOS, N. P.; ADONA, P. R.; NATORI, M. M.; SCHWARZ, K. R. L.; DE BEM, T. H. C.; LEAL, C. L. V. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 116, p. 233-243, 2009.

PRATA-LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 987-995, 2004.

QURESHI, S.; AL-SHABANAH, O. A.; AL-HARBI, M. M.; AL-BEKAIRI, A. M.; RAZA, M. Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 165, p. 1–11, 2001.

PEREIRA, Danielle Dutra *et al.* Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de *Ehrlich* implantado em camundongos swiss. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 4, p. 911-938, 2019.

PEREIRA, Danielle  
Dutra *et al.* Atividade  
antitumoral da  
melatonina sobre  
o tumor de *Ehrlich*  
implantado em  
camundongos swiss.  
*SALUSVITA*, Bauru, v. 38,  
n. 4, p. 911-938, 2019.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6. ed.  
Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.

REDINS, G. M.; REDINS, C. A.; NOVAES, J. C. The effect of  
treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal  
gland: a quantitative study. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos,  
v. 61, p. 679-684, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; QI, W.; MANCHESTER, L. C.;  
KARBOWNIK, M.; CALVO, J. R. Pharmacology and physiology  
of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo.  
**Biological Signals and Receptors**, Basel, v. 9, p. 160-171, 2000.

SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; LEON, J.; MANCHESTER,  
L.; REITER, R. J. Melatonin reduces prostate cancer cell growth  
leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA  
independent mechanism. **Prostate**, New York, v. 63, p. 29–43, 2005.

SANTOS, K. R. P.; TEIXEIRA, A. A. C.; TEIXEIRA, V. W.; SILVA  
NETO, E. J. Análise Histológica do Ovário de Ratas Submetidas à  
Ausência de Luz. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João  
Pessoa, v. 10, p. 269-276, 2006.

SCALDAFERRI, P. M. S.; SOUSA-NETO, J. A. **Revista Brasileira  
de Cancerologia**. Rio de Janeiro, v. 51, p. 49-58, 2005.

SHIRASUNA, K.; ASAHI, T.; SASAKI, M.; SHIMISU, T.;  
MIYAMOTO, A. Distribution of arteriovenous vessels, capillaries  
and eNOS expression in the bovine corpus luteum during the estrus  
cycle: a possible implication of different sensitivity by luteal phase to  
PGF2 $\alpha$  in the increase of luteal blood flow. **Journal of Reproduction  
and Development**, Japan, v. 56, p. 124-130, 2010.

SIROTKIN, A. V.; SCHAEFFER, H. J. Direct regulation of  
mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin.  
**Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 154, p. 1-5, 1997.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control  
of progesterone secretion during the estrous cycle and early  
pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels  
associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy.  
**Endocrinology**, Los Angeles, v. 96, p. 219-226, 1975.

SOUZA, M. I. L.; TEODORO, M. C.; GRESSLER, M. A. L.;  
TOFFOLI-KADRI, M. C. O óxido nítrico na função ovariana.  
**Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 12, p. 6-16, 2013.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K.  
Regulation of luteal function and corpus luteum regression in  
cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular

communication. **Reproduction in Domestic Animals**, San Diego, v. 43, p. 57-65, 2008.

SOUZA, M. I. L.; URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; OBA, E.; SÁ-FILHO, O. G.; RAMOS, A. A. Secreção de esteróides ovarianos em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, no Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, p. 1107-1113, 2008.

SOUSA, E. L.; GRANGEIRO, A. R. S.; BASTOS, E. V. G.; RODRIGUES, G. C. R.; SILVA, M. J.; ANJOS, F. B. R.; SOUZA, I. A.; SOUSA, C. E. L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, p. 199-203, 2010.

SRINIVASAN, V. Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 40, p. 668-679, 2002.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; ESQUIFINO, A. I.; CARDINALI, D. P.; MAESTRONI, G. J. Melatonin, environmental light, and breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, The Hague, v. 108, p. 339-350, 2008.

SUH, K. S. Soybean inhibit tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. **Phytochemistry**, Toronto, v. 63, p. 209-215, 2003.

TAIMOR, G.; HOFSTAETTER, B.; PIPER, H. M. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. **Cardiovascular Research**, London, v. 45, p. 588-594, 2000.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; RUSSEL, J. R. Melatonin and the ovary: Physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, New York, v. 92, p. 328-343, 2009.

VIJAYALAXMI, T. C. R.; REITER, R. J.; HERMAN, T. S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 20, p. 575-601, 2002.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological method for morphometrics cytology. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 30, p. 23-38, 1966.

WINK, D. A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M. W.; MITCHELL, J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, New York, v. 19, p. 711-721, 1998.

PEREIRA, Danielle Dutra *et al.* Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de *Ehrlich* implantado em camundongos swiss. **SALUSVITA**, Bauru, v. 38, n. 4, p. 911-938, 2019.