

DANIELLE DUTRA PEREIRA

**EFEITO DA MELATONINA E DO ESTRÓGENO SOBRE O CRESCIMENTO
DO TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS SWISS**

**RECIFE
2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

DANIELLE DUTRA PEREIRA

EFEITO DA MELATONINA E DO ESTRÓGENO SOBRE O CRESCIMENTO DO
TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS SWISS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal.

ORIENTADOR:

PROF. DR. JOAQUIM EVÊNCIO NETO

CO-ORIENTADOR:

PROF. DR. GEORGE CHAVES JIMENEZ

RECIFE
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

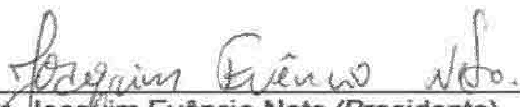
EFEITO DA MELATONINA E DO ESTRÓGENO SOBRE O CRESCIMENTO DO
TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS SWISS

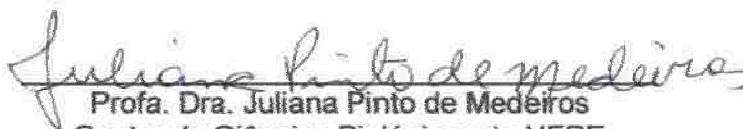
Dissertação de Mestrado Elaborada Por

DANIELLE DUTRA PEREIRA


Aprovada em 19 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE


Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros
Centro de Ciências Biológicas da UFPE


Profa. Dra. Ligia Reis de Moura Estevão
PNPD/UFRPE.


Prof. Dr. George Chaves Jimenez
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

RECIFE

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, o centro da minha vida, por estar sempre no meu caminho, iluminando, guiando às escolhas certas e me sustentando em Suas mãos para que eu não tropece em meio as adversidades e provações.

A meus pais, Joaz Urbano Pereira e Rute Dutra de Arruda, que me criaram e proporcionaram minha educação, tanto escolar quanto moral. Em especial a minha mãe pelo amor incondicional, pelo exemplo de dedicação e perseverança, pela compreensão, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Por muitas vezes ter deixado de lado seus sonhos para acreditar nos meus. Você é responsável por essa conquista e eu a amo muito.

A minha irmã, Gabriela Dutra Pereira, que mesmo distante se fez presente em todos os momentos, apoiando-me e ensinando-me a persistir nos momentos difíceis. Sua lembrança afetuosa e o abraço amoroso a cada reencontro fizeram com que eu chegasse até aqui.

A meu namorado e amigo Victor Hugo, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo e, sobretudo, pelo amor que me reconforta e me dá forças para superar obstáculos. Obrigada por estar sempre ao meu lado fazendo de cada dia um dia especial, por toda a paciência e por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário.

Ao Professor Dr. Joaquim Evêncio Neto, pela orientação, credibilidade, confiança e ensinamentos, que tem sido preciosos para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Obrigada, por tudo que fez por mim, por todas as horas de atenção e por toda compreensão. Obrigada por ter me dado o privilégio de ser sua orientanda.

Ao Professor Antônio Pedro Soares, pelos primeiros incentivos a pesquisa, pela ajuda e pelos conselhos indispensáveis. Também pela amizade, pela dedicação e paciência dispensadas à minha pessoa.

Ao Professor Dr. George Chaves Jimenez, por sua colaboração preciosa desde a concepção deste trabalho, por ter gentilmente cedido o espaço para a realização dos experimentos, pela paciência e disposição em partilhar seus conhecimentos, esclarecendo muitas das minhas dúvidas.

Ao Professor José Ferreira da Silva Neto, profissional responsável e de grande competência, por suas ricas contribuições, ampliando minhas reflexões sobre diversos aspectos deste estudo.

Aos Professores Dr. Romildo Albuquerque Nogueira e Dra. Marliete Soares, professores por quem nutro grande admiração, pelos ensinamentos e pela orientação dedicada durante a época da graduação.

Ao Professor Dr. Álvaro Aguiar Teixeira e a professora Dra. Valéria Wanderley Teixeira, por terem me permitido acompanhar os seus orientandos e pelas sugestões que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Frederico Celso, pela dedicação, apoio e sugestões na leitura das lâminas histológicas e por possibilitar a realização de parte da avaliação dos resultados no laboratório de patologia do Departamento de Medicina Veterinária (UFRPE).

Às minhas amigas, Jeine Silva e Laíse de Souza, pelos incansáveis momentos dedicados a minha pesquisa, por estarem presente em distintos e importantes momentos, por trilharem comigo esta jornada e se tornarem irmãs.

A Wanessa Noadya, Raquel Albuquerque e Jéssica Lima, por todos os momentos vivenciados, os quais, com toda certeza jamais serão esquecidos. O conhecimento e a ciência só têm sentido se compartilhado. Que bom que nós já aprendemos essa lição. Obrigada!

Aos amigos, Leandro Aguiar, Daniella Tavares, Thaís Heloíse, Edbhergue Costa, Franklin Magliano, Clovis Lapa, Ana Lízia e Maria Edna, pela ajuda e empréstimos de materiais. A Priscila Oliveira e Yuri Albuquerque, pela colaboração na parte experimental, que posso dizer ter sido a mais desafiadora etapa deste projeto.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, que dividiram os seus saberes, colaborando para a minha formação acadêmica e profissional. Aos amigos da pós-graduação Veruska Alexandrino, Juliana Arandas, Sandra Souza, Fabiana Felix, Vinícius Vasconcelos, Simone Regina e Gyl Souza, pela amizade e por ajudar a tornar a vida acadêmica muito mais divertida.

A todos os Professores, Técnicos, Funcionários e amigos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), que de uma maneira ou outra contribuíram para este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos durante o curso.

Resumo

Tumores de mama são estrógeno-dependentes e estão relacionados com a primeira causa de morte em cadelas. A proliferação de células cancerígenas, induzida por estrógeno, pode ser suprimida pela melatonina, hormônio produzido da glândula pineal. Sabendo-se da importância da atuação desses hormônios no desenvolvimento de carcinomas mamários, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da melatonina e do estrógeno sobre o tumor de Ehrlich em Camundongos Swiss, através de sua interação com o aparelho reprodutor. Foram utilizados 104 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), com 60 dias de idade, procedentes do Laboratório de Farmacologia do DMFA-UFRPE. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada (22 °C), água e alimentação *ad libitum*. Estes foram divididos nos seguintes grupos (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; H- Pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina; I- Sham-pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina; J- Pinealectomizados tratados com estrógeno; K- Sham-pinealectomizados tratados com estrógeno; L- Pinealectomizados tratados com veículo do estrógeno; M- Sham-pinealectomizados tratados com veículo do estrógeno. Nos ovários, pôde-se observar maior número de folículos no grupo pinealectomizado tratado com estrógeno, e no grupo sham-pinealectomizado tratado com melatonina, houve um aumento no número de corpo lúteo quando comparados aos demais grupos. O crescimento tumoral mostrou-se elevado nos grupos pinealectomizados e nos grupos tratados com estrógeno, enquanto que nos que receberam melatonina observou-se um maior percentual de inibição tumoral. Os animais tratados com estrógeno apresentaram uma sobrevida cumulativa menor em relação aos demais grupos. A análise destes resultados nos permite concluir que o estrógeno e a melatonina, através de sua atuação no ovário, interferem nos mecanismos regulatórios dos processos de crescimento do tumor de Ehrlich.

Palavras-chave: estrógeno, melatonina, pinealectomia, tumor

Abstract

Breast tumors are estrogen-dependent and receptors are related to the first bitch death cause. The cancer cells spreading induced by estrogen, could be melatonin suppressed, that comes from the pineal gland. Knowing the proceeding importance of these hormones on the breast carcinomas development, the purpose of this study was assess the melatonin and estrogen effects on Ehrlich tumor in Swiss mice, through its interaction with the reproductive system. The experiments were carried out in 104 female Swiss mice (*Mus musculus*), 8 weeks old, obtained from the Pharmacology Laboratory from DMFA-UFRPE. The animals were maintained on a 12 hours light/dark cycle, at 22 °C, and food and water were freely available. They were divided in the respective 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; H- Pinealectomized melatonin and estrogen treated; I- Sham-Pinealectomized melatonin and estrogen treated; J- Pinealectomized estrogen treated; K- Sham-Pinealectomized estrogen treated; L- Pinealectomized estrogen vehicle treated; M- Sham-Pinealectomized estrogen vehicle treated. It could be noticed in the ovaries a higher follicle number in pinealectomized estrogen treated group, there was a corpus luteum increase compared to other groups in Sham-Pinealectomized melatonin treated group. The experiments showed a high tumor growth in the pinealectomized groups and in the estrogen treated groups, while it has observed a higher tumor inhibition percentage in the animals that received melatonin treatment. The estrogen treated animals presented a less cumulative survival relative to the other groups. Analysis of these results allows us to conclude that estrogen and melatonin, through its actions in the ovary interfere with regulatory mechanisms of the processes of Ehrlich tumor growth.

Keywords: estrogen, melatonin, pinealectomy, tumor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Neoplasia mamária em cadelas	16
2.2 Os estrógenos	17
2.3 O papel do estrógeno no desenvolvimento da neoplasia mamária.....	20
2.4 Síntese da melatonina pela glândula pineal	22
2.5 Função fisiológica da melatonina	25
2.6 Melatonina e Sistema reprodutor feminino	27
2.7 Ação da melatonina em tumores estrógeno-dependentes.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Local e instalações	32
4.2 Manejo dos animais	32
4.3 Delineamento experimental	32
4.4 Pinealectomia	33
4.5 Tumor experimental	35
4.6 Administração da melatonina e do estrógeno	36
4.7 Cálculo do crescimento tumoral	37
4.8 Percentual de inibição tumoral	38
4.9 Análise de sobrevivência	38
4.10 Coleta do material biológico.....	39
4.11 Microscopia de Luz	39
4.12 Análise histopatológica.....	39
4.13 Análise morfométrica	40
4.14 Análise estatística	40
5. REFERÊNCIAS	41
6. ARTIGO 01.....	55
7. ARTIGO 02	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de secreção de estrógeno pelo eixo hipotálamo- adeno-hipófise.....	19
Figura 2. Regulação do ciclo claro escuro pelos núcleos supraquiasmáticos e produção da melatonina pela glândula pineal.....	25
Figura 3. Esquema da melatonina e alguns dos seus mecanismos de ação – figura demonstrativa dos principais mecanismos de ação descritos para a melatonina. MT (receptores de melatonina), MT ₁ e MT ₂ (receptores de melatonina acoplados à proteína G), ROR (receptor órfão para retinóide), RZR (receptor Z para retinóide), QR2 (quinona redutase 2)	26
Figura 4. Realização da pinealectomia nos camundongos. (A) Incisão na calota craniana com auxílio de micromotor. (B) Retirada do fragmento ósseo. (C) Evidenciação do seio venoso longitudinal dorsal e transversal em forma de Y. (D) Sutura realizada após a retirada da pineal	35
Figura 5. Esquema de reprodução do tumor de Ehrlich sólido	36
Figura 6. Medidas dos diâmetros do tumor. (A) Diâmetro horizontal. (B) Diâmetro vertical	37
 ARTIGO 01	
Figura 1. Peso médio e desvio-padrão dos ovários dos animais nos grupos experimentais.....	70
Figura 2. Número de folículos primários, secundários, terciários e atrésicos, corpo lúteo e vasos sanguíneos nos ovários dos animais nos grupos experimentais.....	70
Figura 3. Fotomicrografia de ovário de camundongos fêmeas nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado e tratado com melatonina. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas) e presença de vasos sanguíneos (V). B- Sham-pinealectomizado e tratado com melatonina. Diversos corpos lúteos (*) e folículos (setas). C- Pinealectomizado sem tratamento. Presença de folículos atrésicos (seta longa). D- Sham-	

pinealectomizado sem tratamento. Presença de corpos lúteos (*) e folículos (setas). E- Pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. Região medular bastante desenvolvida com presença de inúmeros vasos sanguíneos (V). F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. Presença de corpo lúteo (*) e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas curtas). Hematoxilina-Floxina: 100X.....	71
Figura 4. Evolução do crescimento tumoral do 5 ^o ao 12 ^o dia após o implante do tumor.....	71
Figura 5. Inibição do crescimento do tumor de Ehrlich.....	72
Figura 6. Fotomicrografia do Tumor de Ehrlich. A- Presença de necrose (N). B- Extensa área de necrose (setas). C- Área com edema. 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.	72
Figura 7. Sobrevida cumulativa dos animais nos grupos experimentais após o implante do tumor.....	73

ARTIGO 02

Figura 1. Peso médio e desvio-padrão dos ovários dos animais nos grupos experimentais.....	80
Figura 2. Número de folículos primários, secundários, terciários e atrésicos, corpo lúteo e vasos sanguíneos nos ovários dos animais nos grupos experimentais.....	83
Figura 3. Fotomicrografia de ovário de camundongos fêmeas nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. Folículos primários e secundários desenvolvimento (setas), vasos sanguíneos (V) e corpo lúteo (*). B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. Presença corpos lúteos (*) e folículos (setas). C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas). D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. Presença de corpos lúteos (*), folículos (setas) e vasos	

sanguíneos (V). E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas). F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. Presença de corpos lúteos (*) e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas).....	84
Figura 4. Evolução do crescimento tumoral do 6 ^o ao 12 ^o dia após o implante do tumor.....	85
Figura 5. Inibição do crescimento do tumor de Ehrlich.....	88
Figura 6. Figura 6. Fotomicrografia do Tumor de Ehrlich. A- Extensa área de necrose (N). B- Necrose de coagulação (setas). C- Células em apoptose (setas). D- Área com edema (E). E- Presença de células em mitose atípica (setas) e núcleos com nucléolos evidentes (*). F- Células gigantes e multinucleadas (setas). Fig. A: 100X; Fig. (B, C, D, E e F): 400X. Hematoxilina-Floxina.....	91
Figura 7. Sobrevida cumulativa dos animais nos grupos experimentais após o implante do tumor.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento dos grupos experimentais..... 33

ARTIGO 01

Tabela 1. Tratamento dos grupos experimentais..... 69

Tabela 2. Taxa de variação infinitesimal do volume do tumor em função do tempo..... 69

ARTIGO 02

Tabela 1. Tratamento dos grupos experimentais..... 77

Tabela 2. Taxa de variação infinitesimal do volume do tumor em função do tempo..... 86

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HTPD	5-hidroxitriptofano descarboxilase
5-HTP	5-hidroxitriptofano
7TMR	Receptor transmembranal de 7 domínios
AA-NAT	N-Acetiltransferase
CIL	Coluna intermédio-lateral
DBC	Delineamento em blocos casualizados
DMBA	Dimetilbenzol
E ₁	Estrona
E ₂	17 β -estradiol
E ₃	Estriol
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER	Receptor de estrógeno
ER α	Receptores de estrógeno α
ER β	Receptores de estrógeno β
FSH	Hormônios folículo estimulante
GCS	Gânglios cervicais superiores
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HIOMT	Hidroxi-Indol-O-Metiltransferase
IGF-I	Fator de crescimento dependente de insulina
LH	Hormônio luteinizante
MT1	Receptor de melatonina 1
MT2	Receptor de melatonina 2
MT3	Receptor de melatonina 3
NAS	N-acetilserotonina
NC	Nervos coronários
NE	Noradrenalina
NPV	Núcleos paraventriculares hipotalâmicos
NSQ	Núcleos supraquiasmáticos
QR2	Quinona redutase
TG	Triglicerídeos totais
TGF- α	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
TPH	Triptofano-hidroxilase
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
VRH	Via retino-hipotalâmica

1. INTRODUÇÃO

O tumor mamário canino tem despertado grande interesse dos pesquisadores devido a sua elevada incidência (CAVALCANTI e CASSALI, 2006) e grande diversidade morfológica (PELETEIRO, 1994). A etiologia deste tipo de tumor é multifatorial, com a participação de fatores genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Os hormônios são responsáveis por grande parte do controle no metabolismo das células. O descontrole hormonal acarreta a proliferação celular com consequentes mutações genéticas, levando a várias alterações, dentre elas o câncer (HENDERSON e FEIGELSON, 2000; MEUTEN, 2002; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

A forma como os fatores hormonais atuam estimulando ou inibindo o processo de crescimento tumoral tem sido estudada, buscando-se compreender a interação entre diferentes hormônios e suas implicações para o metabolismo celular. Dentre os hormônios que interferem na dinâmica do crescimento tumoral estão a melatonina (SRINIVASAN *et al.*, 2008) e o estrógeno (SILVA, 2003).

Na avaliação do processo de crescimento do tumor de mama está a utilização de tumores experimentais transplantáveis similares, como o tumor de Ehrlich, um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária, originário de camundongos fêmeas (EHRlich e APOLANT, 1905). A vantagem do uso dessa neoplasia recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003). Além de apresentar a característica de se desenvolver em qualquer linhagem de camundongos e de não regredir espontaneamente (SIGIURA, 1965).

Uma forma de verificar alterações na estrutura tumoral consiste na avaliação histopatológica e morfométrica do tumor, que permite verificar diferenças na configuração das células e tecidos, e quantificar o aumento do número celular resultante da ação dos fatores de estímulo e inibição da proliferação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neoplasia mamária em cadelas

A oncologia é uma área de grande importância na Medicina Veterinária (SOUZA *et al.*, 2006). Seu crescimento se deve às neoplasias serem apontadas como a primeira causa de morte em animais de companhia, levando a óbito 45% dos cães com 10 anos de idade ou mais (WITHROW, 2007).

As neoplasias são resultantes de mutações genéticas caracterizadas pela proliferação desordenada e persistente de células de qualquer tecido do organismo, a qual não responde aos seus mecanismos normais de controle (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2004). Neoplasias mamárias são originadas do crescimento descontrolado de populações celulares variadas dos tecidos que compõem a mama, podendo ser classificadas como benignas ou malignas (JOHNSON, 2006) e apresentar grande diversidade morfológica e de tamanho (RUTTEMAN e KIRPENSTEIJN, 2003).

O interesse na obtenção de conhecimentos mais específicos sobre tumores de mama em caninos vem crescendo devido à frequência na ocorrência desse tipo de tumor subjacente ao diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004; CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Em virtude de similaridades biológicas com as neoplasias caninas, tumores experimentais transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, têm despertado o interesse de pesquisadores para empregá-los como modelo comparativo para o estudo desta patologia. O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária de camundongos fêmeas (EHRlich e APOLANT, 1905) e a vantagem do uso dessa neoplasia está no conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas, além do desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (PALERMONETO; MASSOCO; SOUZA, 2003).

Os tumores mamários acometem quase que exclusivamente as fêmeas, sendo rara a ocorrência em machos (DE NARDI *et al.*, 2002; OLIVEIRA, *et al.*, 2003; PIRES; TRAVASSOS; PIRES, 2003). A incidência em caninos é maior do que em qualquer outro animal doméstico (VILLALOBOS e KAPLAN, 2007), sendo a segunda neoplasia mais observada nesta espécie, excedida apenas pelas neoplasias cutâneas. No entanto, quando consideradas somente as fêmeas, é o tipo de tumor

de maior ocorrência (DE NARDI *et al.*, 2002), sendo responsável por aproximadamente 52% de todos os tumores. Destes, aproximadamente 50% apresentam caráter maligno (DE NARDI, 2007), ocorrendo metástase em cerca de 50% dos casos (HEDLUND, 2002). Entre os tumores malignos, os mais observados são os adenocarcinomas (MORRIS *et al.*, 1998; MORRISSON, 1998).

A transformação em células malignas é multifatorial (MORRIS *et al.*, 1998) e envolve a participação de fatores genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (PERSSON, 2000; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). Segundo Rutteman e Kirpensteijn (2003), o desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas são claramente hormônio-dependentes, o que justifica a maior incidência de tumores nas mamas inguinais e abdominais, possivelmente por essas apresentarem um parênquima mamário mais desenvolvido e, conseqüentemente, mais exposto à ação hormonal (PELETEIRO, 1994; RUTTEMAN; WITHROW; MACEWEN, 2001; QUEIROGA e LOPES, 2002).

O sistema endócrino coordena e regula a comunicação entre as células, sendo responsável por funções biológicas normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo (RAPHAEL, 2002). Quando há descontrole da secreção hormonal ocorre uma proliferação celular descontrolada com conseqüentes mutações genéticas, levando a várias alterações, dentre elas o câncer (GUYTON, 1991; HENDERSON e FEIGELSON, 2000; MEUTEN, 2002; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). Desta forma, as modificações organizacionais da glândula mamária, que ocorrem nas cadelas por ação dos hormônios, apesar de fisiológicas podem ensejar alterações neoplásicas diversas em qualquer local do órgão, mas especialmente no tecido epitelial (ZUCCARI *et al.*, 2001).

Os hormônios envolvidos na carcinogênese mamária incluem o estrógeno, a prolactina (DENG e BRODIE, 2001; SILVA, 2003), a progesterona (VORHERR, 1987), os andrógenos (KODAMA e KODAMA, 1970) e os hormônios tireoidianos (SILVA, 2003; FERREIRA, 2005).

2.2 Os estrógenos

Os hormônios sexuais podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos (estrógenos), hormônios sexuais masculinos

(andrógenos) e hormônios da gravidez (progestógenos) (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). Dentre estes, os estrógenos têm sido intensamente estudados por serem compostos extremamente ativos biologicamente e estarem relacionados à etiologia de vários tipos de cânceres (DOS REYS, 2001).

Os estrógenos constituem um grupo de hormônios esteroides com 18 carbonos, derivados do colesterol e secretados principalmente pelo ovário e, em menor quantidade, pelas adrenais. Englobam três hormônios estruturalmente semelhantes, o 17β -estradiol (E_2), a estrona (E_1) e o estriol (E_3) (GRUBER *et al.*, 2002; KENDALL e ESRON, 2002; REIS FILHO *et al.*, 2006), que atuam exercendo uma grande variedade de efeitos sobre o crescimento, desenvolvimento e diferenciação de diversos tecidos. A ação reguladora primária desses hormônios está restringida principalmente aos órgãos reprodutivos, mas podem regular processos em outros tecidos, como osso, fígado e sistema cardiovascular (KATZENELLENBOGEN *et al.*, 2000).

A secreção dos estrógenos é regulada pelo eixo hipotálamo-adenohipófise. Em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), a hipófise anterior secreta os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). No sexo feminino, a função do FSH é estimular o crescimento folicular e a síntese de estrógeno pelas células da granulosa (WANKE e GOBELLO, 2006), enquanto que o LH induz a ovulação e transforma a camada da granulosa e a teca interna em uma glândula endócrina, o corpo lúteo. Ainda sob efeito do LH, as células modificam seus componentes enzimáticos e começam a secretar progesterona e estrógenos. Nesta fase, os hormônios gonadais agem no hipotálamo regulando a secreção de GnRH, por meio de um mecanismo de retroalimentação negativa. Peptídeos produzidos no ovário, como a inibina e a ativina, também modulam negativamente a secreção de FSH (Fig. 1) (BULUN e ADASHI, 2003).

Os estrógenos são liberados através da corrente sanguínea até os tecidos alvos, nos quais entram na célula por difusão ou transporte ativo. O mecanismo de ação deste esteroide ocorre através da sua união a um fator de transcrição específico localizado na célula, denominado receptor de estrógeno (ER), que regula a atividade de genes e modifica a resposta celular e tecidual dos órgãos alvos (WANG; ERIKSSON; SAHLIN, 2000).

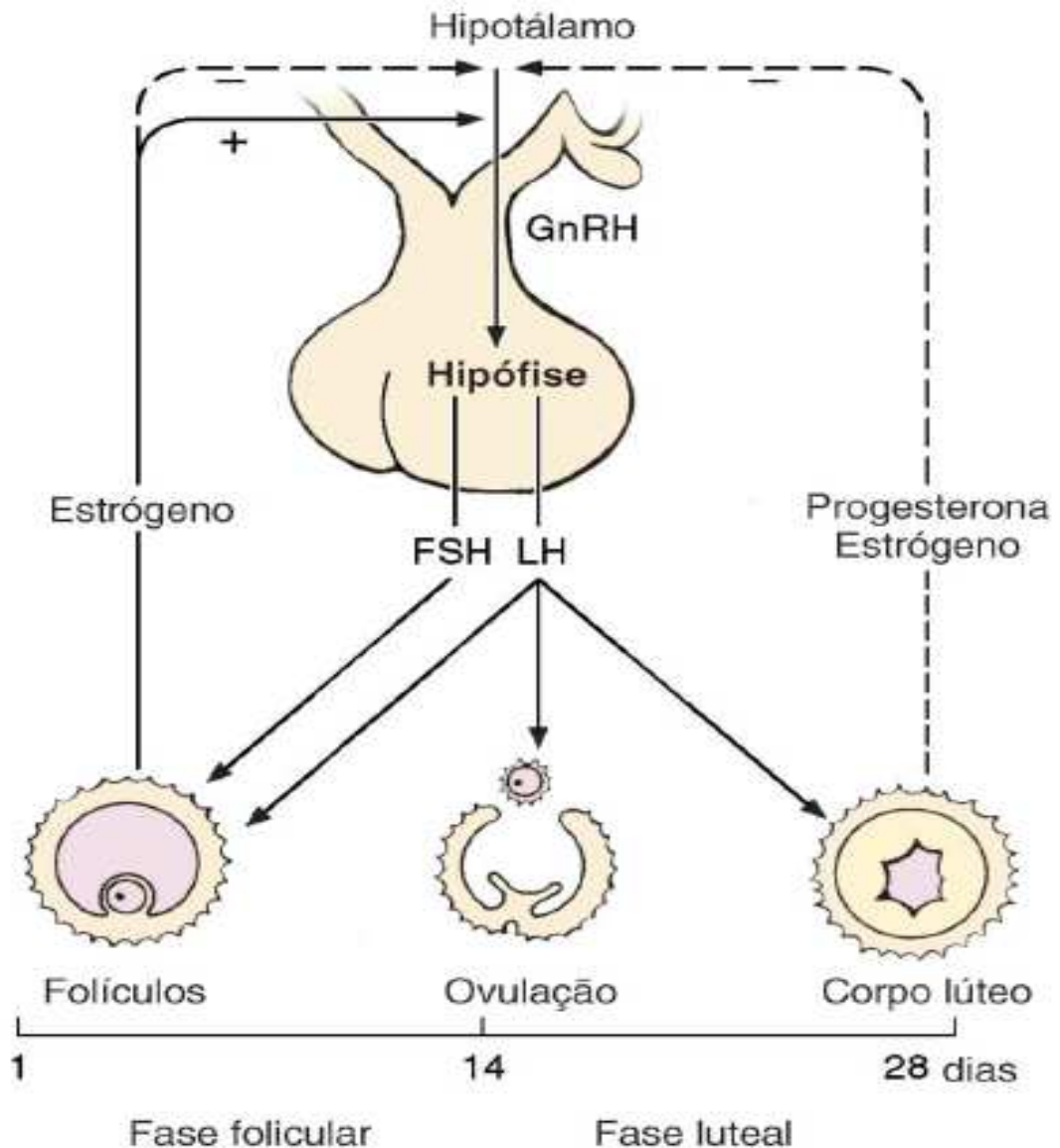


Figura 1. Esquema da secreção de estrógeno pelo eixo hipotálamo-adenohipofisário (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Os ERs pertencem a uma ampla família de receptores hormonais nucleares estimulados pelos ligantes (ARANDA e PASCUAL, 2001; KRISHNAN; HEATH; BRYANT, 2001). Atualmente, são conhecidos os receptores de estrógeno α (ER α) e β (ER β), formados por uma cadeia de 565 e 530 aminoácidos, respectivamente (MANGELSDORF *et al.*, 1995; KUIPER *et al.*, 1998). Existe um terceiro e novo receptor de estrógeno intracelular transmembranar de 7 domínios (7TMR), conhecido como GPR30, que atua de maneira independente do ER α e do ER β , mas influencia na ativação do fator de crescimento epidermal (EGF), podendo assim participar na biologia do câncer de mama (FILARDO *et al.*, 2006).

O padrão tecidual de expressão dos ER α e ER β é diferente, embora haja algumas sobreposições. Os ER α são expressos predominantemente em órgãos reprodutivos (útero, mama e ovário), no fígado e no sistema nervoso central, enquanto que os ER β são expressos em outros tecidos como no osso, endotélio, pulmão, trato urogenital, ovário, sistema nervoso central e próstata (NILSSON *et al.*, 2001; ANDERSON, 2002).

A concentração intracelular de receptores de esteroide determina a resposta hormonal e vários fatores de interação controlam seus níveis. O complexo receptor-esteróide pode estimular a transcrição do RNAm e atenuar a síntese de novas moléculas de receptores. Os fatores de crescimento podem ser capazes de ativar alguns receptores de esteroides, particularmente o receptor de estrógeno. Em culturas celulares o IGF-I (fator de crescimento dependente de insulina), EGF e TGF- α (fator de crescimento transformador), podem estimular a transcrição de genes alvos para estrógeno, pela ativação do receptor de estrógeno (WILSON *et al.*, 1998).

O conhecimento da expressão fisiológica dos ER nos diferentes tecidos alvos é de grande importância já que pode auxiliar no estudo de afecções que sofrem influência hormonal. Em humanos, vários estudos correlacionaram os tumores mamários com a presença de receptores de esteroides (REICH *et al.*, 2000).

2.3 O papel do estrógeno no desenvolvimento da neoplasia mamária

Hormônios ovarianos em doses elevadas e por períodos longos, induzem a proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias, promovendo o crescimento celular e, desta forma, propiciando as condições necessárias para que as mutações genéticas ocorram (TATEYAMA e COTCHIN, 1977; MEUTEN, 2002). Esses hormônios agem sobre as células da mama com diferentes intensidades, de acordo com a fase do ciclo estral, favorecendo a desorganização deste tecido. O que justifica a incidência de tumores mamários de 0,5% em cadelas com a castração antes do primeiro cio, 8% após o primeiro ciclo estral e 26% após dois ou mais ciclos, até os dois primeiros anos (JOHNSTON, 1993; MAC EWEN e WITHROW, 1996). Zuccari *et al.* (2001), mostraram que a utilização de terapia hormonal com fins contraceptivos, ou em casos de pseudociese, provocam predisposição ao aparecimento de neoplasia mamária. A proliferação celular desse tipo de tumor é significativamente exacerbada pelo estrógeno (RAZANDI; PEDRAM; LEVIN, 2000).

Os ERs têm sido identificados em cadelas com mama normal, apresentando tumores benignos e carcinomas (MOULTON, 1990; PELETEIRO, 1994; MEUTEN, 2002). Estes receptores desempenham um papel fundamental na fisiopatologia do câncer de mama (FUQUA *et al.*, 1999; SPEIRS e KERIN, 2000; WITEK *et al.*, 2003), sendo expressos em aproximadamente 70% desses tumores (MORALES-VÁZQUEZ, 2006). A presença desses receptores no núcleo de células tumorais é um sinal claro da dependência hormonal dessas neoplasias, principalmente quando há coexistência dos dois receptores ao mesmo tempo (MOULTON, 1990; PELETEIRO, 1994; MEUTEN, 2002).

Os estrógenos podem atuar no crescimento de tumores mamários induzindo mitoses em células iniciadas (LEE e LEE, 2001) e interferindo na expressão do gene *bcl-2*, que controla o processo de apoptose. Em células tumorais, a concentração de estrógeno retarda o processo de apoptose (SUH *et al.*, 2003). Estudos também apontam o estrógeno como um importante fator modulador da função vascular em diversas condições patológicas, como no desenvolvimento carcinogênico (RUBANYI; JOHNS; KAUSER, 2002).

A observação de que o crescimento das neoplasias mamárias é regulado pelos estrógenos tem tido um impacto fundamental na abordagem terapêutica desse grupo de tumores (COTE e TAYLOR, 1994). A terapia endócrina constitui uma parte essencial do tratamento, tanto na configuração inicial como na doença metastática. Existem dois recursos farmacológicos para reduzir o efeito do estrógeno em células tumorais: a inibição de sua ação com agentes antiestrogênicos e a prevenção de sua produção através da inibição da enzima aromatase (MORALES-VÁZQUEZ, 2006).

Na busca pela inibição do crescimento tumoral, observou-se que a melatonina tem requisitos para ser considerada fármaco antiestrogênico, podendo tanto atuar nos receptores de estrógeno (MARTINEZ-CAMPA *et al.*, 2005) como controlar a produção de hormônios gonadais, levando a um efeito inibitório sobre tumores hormônio-dependentes eliminando a capacidade metastática de células (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

2.4 Síntese da melatonina pela glândula pineal

A melatonina, neurohormônio pertencente ao grupo das indolaminas, foi isolada da glândula pineal em 1958. A molécula foi assim chamada, devido sua atividade sobre melanóforos dermais ("mela") e sua derivação da serotonina ('tonina') (LERNER *et al.*, 1958).

A glândula pineal é comum a todos os vertebrados (REITER *et al.*, 1981) e consiste em uma estrutura epitalâmica pequena, situada dorsalmente às regiões caudais do diencefalo, entre os dois hemisférios cerebrais (COMMENTZ e HELMKE, 1995). Deriva de células neuroectodérmicas e desenvolve-se a partir de uma invaginação do teto do terceiro ventrículo, de maneira similar a retina (KAPPERS, 1960). Difere da quase totalidade do cérebro pela ausência da barreira hematoencefálica (REICHLIN, 1992) e apresenta uma intensa irrigação sangüínea, sendo o segundo órgão (perdendo somente para o rim) com maior fluxo de sangue em relação à massa de tecido. Os numerosos capilares entre as células parenquimatosas permitem intensa atividade metabólica. A irrigação sanguínea é maior durante o período noturno, estando provavelmente relacionado ao aumento do metabolismo indólico nesse período (REITER *et al.*, 1981).

Histologicamente o parênquima da pineal é constituído por dois tipos de células, os pinealócitos e as neuroglias. Os pinealócitos são predominantes, estando organizados em cordões situados sobre a membrana basal, onde se relacionam com o espaço intersticial (PRESLOCK, 1984; FRANKLIN; EPSTEIN; AMNON, 1997). Possuem numerosas ramificações com as extremidades dilatadas e apresentam o citoplasma com moderada quantidade de ribossomos, pouco retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso desenvolvido e inúmeras vesículas cujas funções são desconhecidas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Os pinealócitos produzem uma série de substâncias biologicamente ativas, entre elas as aminas biogênicas (noradrenalina, histamina, melatonina, serotonina, dopamina e octamiona) e pequenas quantidade de alguns peptídeos, como o GnRH, o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e a arginovasitocina (BENSON *et al.*, 1976; LEWY, 1983; FRANKLIN; EPSTEIN; AMNON, 1997).

A melatonina é a principal produção da glândula pineal. Sua secreção ocorre em maior proporção durante a noite (QUAY, 1956; VANECEK, 1998; JUNG e AHMAD, 2006), em resposta a impulsos nervosos controlados negativamente pela

luz ambiental (WURTMAN, AXELROD; PHILLIPS, 1963; 1964; MOORE *et al.*, 1968). Esta observação foi confirmada por relatórios que apresentaram a atividade da enzima hidroxindol O-metiltransferase, necessária para a síntese de melatonina, maior à noite do que durante o dia (AXELROD; WURTMAN; WINGET, 1964).

O tempo de secreção da melatonina é proporcional ao comprimento do período da escuridão (CAGNACCI, 1996). Esta característica de secreção determina o papel fisiológico da glândula pineal: sinalizar para o meio interno, pela presença ou ausência de melatonina nos líquidos corporais, se é dia ou noite no meio exterior e, através das características do seu perfil plasmático noturno, qual a estação do ano (MARONDE e STEHLE, 2007; HISSA *et al.*, 2008). Desta forma, a pineal confere ritmos a uma série de funções neuroendócrinas que modula, determinando, por exemplo, o ciclo sono-vigília, a atividade reprodutora e a atividade metabólica de várias espécies (BARTNESS e GOLDMAN, 1989).

Existe uma única via neural que regula a atividade metabólica da pineal (VOLLRATH, 1981), com origem nos fotorreceptores da retina, que são células ganglionares altamente especializadas (PANDA *et al.*, 2005; QIU *et al.*, 2005). Esses receptores enviam informações da luminosidade ambiental através de projeções diretas da via retino-hipotalâmica (VRH) para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ), que estão localizados no hipotálamo anterior e representam o principal relógio mestre circadiano (MARKUS *et al.*, 2003; HASTINGS; MAYWOOD; REDDY, 2008). À noite, na escuridão, os NSQ transmitem um sinal elétrico para a glândula pineal que provoca a liberação de noradrenalina (NE) das terminações nervosas pós-ganglionares simpáticas para os pinealócitos, que iniciam e mantêm, via receptores β -adrenérgicos, a elevada produção de melatonina (MARONDE e STEHLE, 2007).

O circuito neural que liga os NSQ a glândula pineal de mamíferos é extremamente complexo. Os NSQ projetam-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPV) que apresentam projeções diretas ou indiretas para a região torácica da medula espinhal, na coluna intermédio-lateral (CIL), sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos, que por sua vez, enviam seus axônios aos gânglios cervicais superiores (GCS), os quais, pelos ramos carotídeos internos e nervos coronários (NC), projetam-se até a pineal (CIPOLLA-NETO e AFECHE, 1999).

A biossíntese da melatonina nos pinealócitos utiliza o aminoácido triptofano, que é captado da circulação e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), pela ação da enzima triptofano-hidroxilase (TPH), cuja atividade será aumentada na fase de

escuro. A 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) remove o grupo alfa-carboxilterminal do 5-HTP e o transforma em serotonina (5-hidroxitriptamina). As concentrações de serotonina são elevadas na pineal e sua conversão em melatonina envolve duas enzimas principais: a N-Acetiltransferase (AA-NAT) e a Hidroxi-Indol-O-Metiltransferase (HIOMT). A primeira catalisa a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS) e a segunda transfere um grupo metil da 5-adenosil-metionina para a N-acetilserotonina, originando a 5-metoxi-acetilriptamina ou melatonina (fig. 2) (BOUTIN *et al.*, 2005; HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006).

Além da glândula pineal, há outras fontes produtoras deste hormônio (HARDELAND, 2009), como a retina, o corpo ciliar da íris, as glândulas harderianas e lacrimais, os linfócitos e o intestino grosso (SOARES *et al.*, 2003; MACCHI e BRUCE, 2004; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Estudos recentes demonstraram que a melatonina também é produzida na placenta humana (LANOIX *et al.*, 2008) e por células que participam dos processos de defesa do organismo, sendo sua produção ativada por agente injuriante em linfócitos humanos (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004) e macrófagos de ratos (MARTINS *et al.*, 2004). Essas outras fontes tem contribuição mínima para a concentração da melatonina plasmática, porém, apresentam importantes ações locais (SOARES *et al.*, 2003; MACCHI e BRUCE, 2004; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

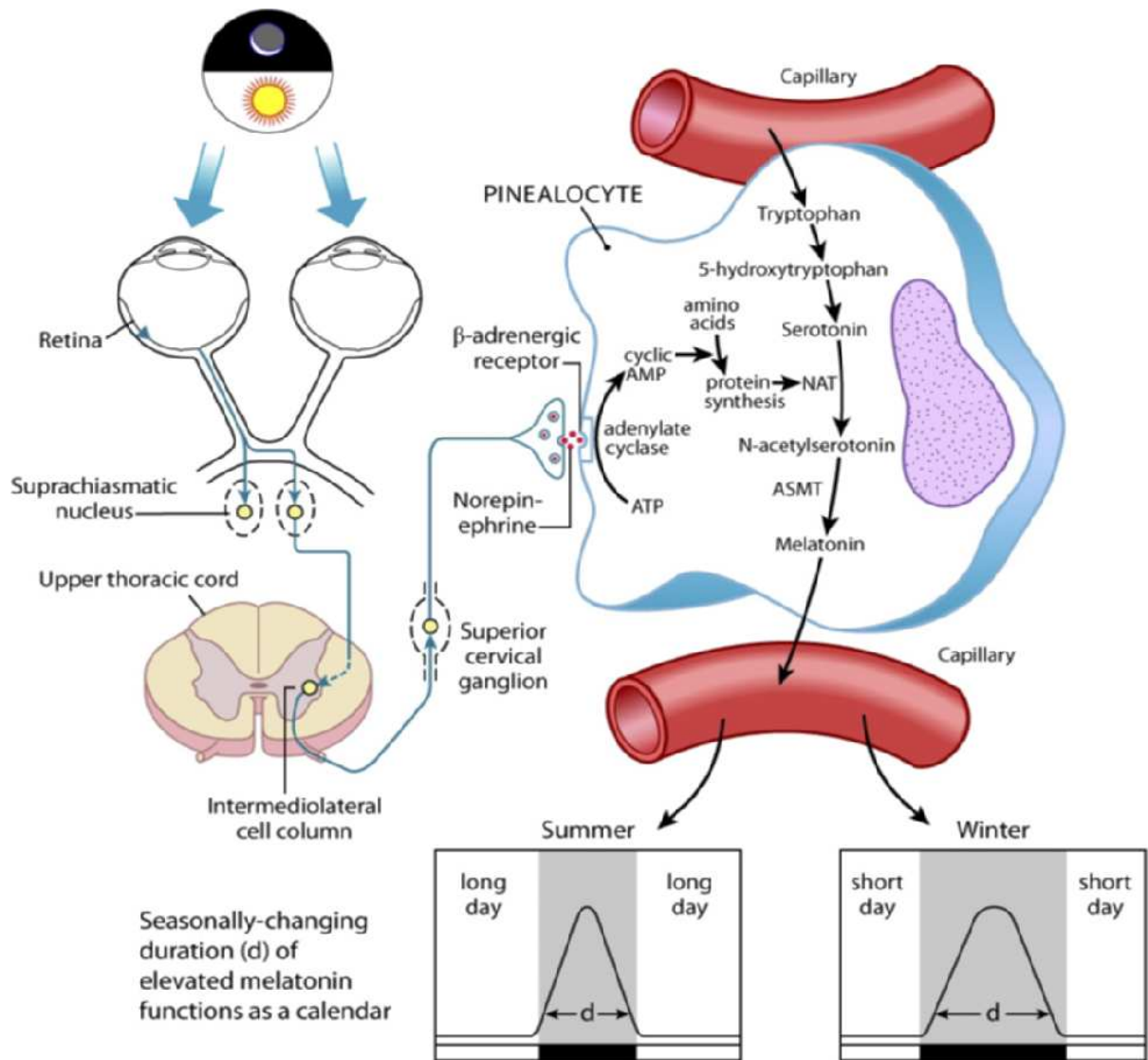


Figura 2. Regulação do ciclo claro escuro pelos núcleos supraquiasmáticos e produção da melatonina pela glândula pineal (Adaptado de REITER *et al.*, 2009).

2.5 Função fisiológica da melatonina

A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina, é um composto orgânico altamente lipossolúvel que se difunde no fluxo sanguíneo, onde é transportado principalmente ligado a proteínas, em especial a albumina (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005), para órgãos distantes e também para o líquido cefalorraquidiano chegando ao hipotálamo e ao sistema nervoso central (HILL, 2009). A vida média da melatonina endógena é de 30 a 60 minutos e a melatonina exógena tem uma meia-vida ainda mais curta, de 12 a 48 minutos (VIJAYALAXMI; REITER; HERMAN, 2002; SOARES *et al.*, 2003).

A produção da indolamina varia ao longo do desenvolvimento ontogenético. Na espécie humana, a maior concentração de melatonina ocorre durante a infância, decrescendo rapidamente antes do início da puberdade e sofrendo queda acentuada durante a senectude. Postula-se que a melatonina tem um papel importante durante o ciclo da vida, ou seja, no crescimento, desenvolvimento e amadurecimento, bem como no processo de envelhecimento (LANGER *et al.*, 1997).

Esse hormônio exerce seus efeitos biológicos através de receptores de membrana, sítios de ligação nucleares e pela interação com moléculas citosólicas. Entretanto, muito do que se sabe sobre as ações regulatórias da melatonina provem da sua ligação à receptores da membrana celular. Estes receptores foram descobertos em praticamente todos os órgãos e em muitas células em todos os organismos (DUBOCOVICH e MARKOWSKA, 2005), e são atualmente identificadas como MT1, MT2 e MT3 (DUBOCOVICH *et al.*, 2003), pertencentes a família de receptores acoplados a proteína G, com sete domínios transmembrana (KATO *et al.*, 2005). Contudo, alguns autores questionam se este último receptor (MT3) existe ou é uma enzima, a quinona redutase (QR2) (fig. 3) (NOSJEAN *et al.*, 2001; BOUTIN *et al.*, 2008).

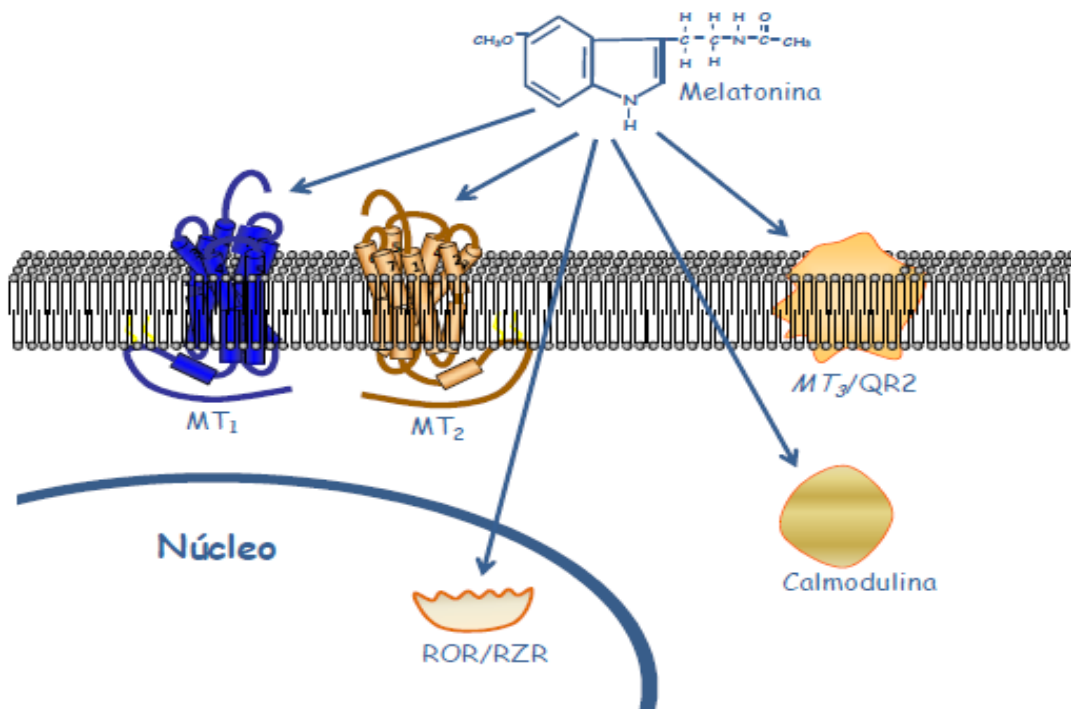


Figura 3. Esquema da melatonina e alguns dos seus mecanismos de ação – figura demonstrativa dos principais mecanismos de ação descritos para a melatonina. MT (receptores de melatonina), MT₁ e MT₂ (receptores de melatonina acoplados à proteína G), ROR (receptor órfão para retinóide), RZR (receptor Z para retinóide), QR2 (quinona redutase 2) (TAMURA *et al.*, 2009).

A melatonina influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite: a digestão torna-se mais lenta, a temperatura corporal cai, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado (CARLBERG, 2000; REITER; TAN; KORKMAZ, 2009; SIMKO e PECHANOVA, 2009). Parece ser capaz de aumentar a mobilidade e a atividade das células de defesa, estimular a formação dos anticorpos e facilitar a defesa contra os microrganismos (MACCHI e BRUCE, 2004; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Supõe-se que a melatonina também atue como antioxidante poderoso (REITER *et al.*, 1995; CUZZOCREA e REITER, 2001); module respostas imuno-estimulantes na prevenção de várias neoplasias, como a de mama, próstata, estômago, pulmão e fígado (BLASK e HILL, 1986); possua propriedades redutoras de colesterol e ainda com base muito empírica teria um efeito “antienvhecimento” (REITER e ROBINSON, 1996). Em mamíferos, estudos realizados por Malpaux *et al.* (2001) apontaram a melatonina como o principal sinalizador para o estado reprodutivo, o que também foi observado em peixes por Falcón *et al.* (2007) e em aves por Aste *et al.* (2001).

2.6 Melatonina e Sistema reprodutor Feminino

O papel da melatonina no desenvolvimento sexual e na reprodução humana tem sido bastante investigado. O interesse da atuação desse hormônio nas gônadas aumentou muito nos últimos anos com a identificação de sítios de ligação da melatonina (SIROTKIN e SCHAEFFER, 1997) e da caracterização dos MTs em ovários de ratas (DUBOCOVICH *et al.*, 2003; TAMURA *et al.*, 2009). Além disso, há dados que indicam que os níveis de melatonina oscilam durante o ciclo menstrual, sendo mais baixos durante a ovulação, elevando-se nos dias subsequentes, atingindo níveis mais altos durante a menstruação. Outro fato relevante é a presença de concentrações muito elevadas de melatonina no fluido folicular ovariano, sendo três vezes superiores aos da corrente sanguínea (RÖNNBERG *et al.*, 1990; NAKAMURA *et al.*, 2003).

Em mamíferos, a melatonina é amplamente aceita como reguladora da reprodução, pela capacidade de influenciar a função gonadal e promover a ciclicidade estral (DAIR *et al.*, 2008; MAGANHIN *et al.*, 2008). Em estudos experimentais com ratas e hamster, a retirada da pineal e consequente redução dos níveis de melatonina, leva à abertura vaginal precoce, hipertrofia ovariana e

aumento da queratinização das células vaginais e anovulação crônica (WURTMAN, AXELROD; PHILLIPS, 1963; HOFFMAN e CULLIN, 1975; REITER *et al.*, 1981; DAIR *et al.*, 2008). Em contraste, a administração da melatonina reduz o peso dos ovários, retarda o amadurecimento sexual (WURTMAN, AXELROD; PHILLIPS, 1963) e é capaz de reverter o ciclo estral contínuo e anovulatório transitório (MAGANHIN *et al.*, 2008).

A melatonina tem requisitos para ser considerada fármaco antiestrogênico (MARTINEZ-CAMPA *et al.*, 2005). As suas ações ocorrem em nível de hipotálamo, adeno-hipófise, e órgãos sítio (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010). No hipotálamo, sua ação é mediada por receptores que podem alterar a secreção dos pulsos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez, controla a secreção das gonadotrofinas - hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) - pela hipófise e a produção de estrógeno e progesterona no ovário (ADASHI, 1991; CATT e DAFAU, 1991). A frequência de liberação do GnRH é de aproximadamente, um pulso a cada 90 minutos na fase folicular, e a cada 220 minutos, na fase lútea. Sua liberação pode ser modificada pela melatonina, principalmente durante o final da fase lútea e o início do período menstrual, com diminuição da frequência dos pulsos (DÍAZ *et al.*, 2005).

A indolamina pode agir também na síntese de estrógenos pela inibição de enzimas (aromatase), que controlam sua interconversão a partir de seus precursores androgênicos, e interferir nos receptores de estrogênio (MARTINEZ-CAMPA *et al.*, 2005). Através de seu controle sobre a produção de hormônios gonadais, a melatonina pode ter um efeito inibitório sobre tumores hormônio-dependentes e limitar a capacidade metastática de células (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

2.7 Ação da melatonina em tumores estrógeno-dependentes

Na década de 1970, estudos demonstraram possíveis efeitos antimetabólicos da melatonina. Observou-se que ela interagiu com os microtúbulos (WINSTON *et al.*, 1974) e que era capaz de inibir a mitose em três diferentes linhagens de células (BINDONI; JUTISZ; RIBOT, 1976). Suspeitou-se assim, que ela poderia exercer alguma atividade antineoplásica.

A melatonina exerce ações antiproliferativas em culturas de diversas linhagens de células derivadas de tumores, incluindo carcinoma do ovário, bexiga,

prolactinomas, hepatoma e o neuroblastoma (BLASK, 1993). Os trabalhos mais importantes foram realizados com as células MCF-7, provenientes do câncer de mama humano, positivas para receptores estrogênicos (BLASK e HILL, 1986). A melatonina mostrou inibir a proliferação destas células, assim como de outras linhagens que também são positivas para estes receptores, tais como T47D e ZR75-1 (HILL e BLASK, 1992).

A concentração da melatonina além de inibir o crescimento e proliferação de células cancerígenas, reduz a incidência de metástase (SRINIVASAN *et al.*, 2008), como também diminui a gênese tumoral, limitando o evento inicial, ou seja, danos no DNA, que precede a mutação necessária para o desenvolvimento do tumor (LUNENFELD, 2006).

A pinealectomia, remoção cirúrgica da glândula pineal, em modelos de roedores, acelera o crescimento e o aumento da incidência de cânceres experimentais (DAS GUPTA e TERZ, 1967; ALBERT; PRADE; BOHMON, 1970). Em contrapartida, a administração de melatonina exógena impede o crescimento e desenvolvimento de vários tipos de câncer induzidos e transplantados (BLASK; SAUER; DAUCHY, 2002).

Tamarkin *et al.* (1981) mostraram que a pinealectomia aumenta o índice de câncer de mama em ratos tratados com dimetilbenzol (DMBA), ao passo que injeções de melatonina inibem o crescimento do tumor. Estudos realizados por Blask (1993) mostraram que a administração exógena de melatonina inibe o crescimento de vários tumores transplantáveis, incluindo o tumor de Ehrlich, o fibrossarcoma e o sarcoma de Yoshida. Sainz *et al.* (2005), mostraram que o tratamento do câncer de próstata com concentrações farmacológicas significativas de melatonina, estagna a progressão do ciclo celular e reduz o número de células de tumor andrógeno-dependente e andrógeno-independente. Vários estudos têm mostrado também níveis reduzidos de melatonina em pacientes com certos tipos de câncer, em comparação com pessoas normais e saudáveis da mesma idade (BLASK; DAUCHY; SAUER, 2005; MILLS *et al.*, 2005; LEE, 2006).

Os efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina podem estar relacionados às suas propriedades bioquímicas e/ou metabólicas (KARBOWNIK e REITER, 2000). Estudos comprovaram que a melatonina apresenta atividade antioxidante, diminuindo a formação de radicais livres e reduzindo as lesões ao DNA (LISSONI *et al.*, 1996; KARBOWNIK e REITER, 2000; ASSAYED e ABD EL-ATY,

2009). Além de evitar a destruição do genoma, a melatonina pode também auxiliar na sua reparação uma vez que tenha sido mutilado (SLIWINSKI *et al.*, 2007).

Outra hipótese sobre a ação da melatonina está relacionada a resposta imunológica inespecífica (REITER e ROBINSON, 1995). Receptores deste hormônio foram encontrados em linfócitos T-helper e monócitos. Através da ligação da indolamina aos primeiros, há estímulo para a produção de interleucina-4, que aumenta a atividade de outras células da resposta imune. Há estímulo à produção de células "Natural Killer" (COLLINS *et al.*, 2003). A melatonina também apresenta ação inibitória sobre a produção do fator de necrose tumoral (TNF), provavelmente por sua atividade antioxidante. Outros efeitos metabólicos da melatonina já foram sugeridos em situações mais específicas, como a inibição *in vivo* da captação de ácido linoléico e consequente redução de sua conversão intracelular em um produto mitogênico em células de hepatoma 7288CTC (BLASK *et al.*, 1999).

Adicionalmente, a melatonina suprime a atividade proliferativa de células tumorais (SHIU, 2007), como também possui ações antimetastáticas, provavelmente devido à sua capacidade de aumentar a produção de moléculas de adesão da superfície celular, impedindo a ruptura da matriz intracelular (COS e SANCHEZ-BARCELO, 2000). Além dessas ações, a melatonina causa a transformação de células cancerígenas propensas à divisão celular em células mais resistentes a mitose (SAINZ *et al.*, 2005). Deste modo, a melatonina limita a progressão do tumor, por meio de sua ação anti-proliferativa e antimetastática (REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010).

Em células de câncer de mama humano, a melatonina pode suprimir a proliferação induzida por estrogênio (HILL e BLASK, 1988). Ram *et al.* (1998) relataram que a melatonina pode inibir a atividade transcricional dos ER α , induzida por estrógeno, enquanto induz a expressão de vias inibitórias de crescimento e apoptose. Um mecanismo proposto para a ação oncostática da melatonina no câncer de mama (COLLINS *et al.*, 2003) é a inibição do GnRH, dificultando assim a liberação dos hormônios LH e FSH e, por consequência, reduzindo a produção ovariana de estradiol. Dessa forma se reduz a resposta mitogênica do câncer ao estradiol, o que pode explicar os efeitos protetores do hormônio neste tipo de câncer. A melatonina induz também um atraso na transição G1/S em linhagens de células MCF-7 do câncer de mama humano (BLASK e HILL, 1986).

Outros mecanismos importantes através do qual a melatonina retarda o crescimento de tumores dependentes de hormônios incluem a sua capacidade para inibir a aromatase, uma enzima que metaboliza precursores de andrógenos para estrógenos (KIEFER *et al.*, 2005).

Estudos *in vivo* têm sido conduzidos para determinar a eficácia da melatonina sobre carcinomas da mama (VIJAYALAXMI; REITER; HERMAN, 2002; MARTIN *et al.*, 2006). Um achado comum da maioria destes estudos *in vivo* é que a melatonina não tem quaisquer efeitos secundários desfavoráveis (VIJAYALAXMI; REITER; HERMAN, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o efeito do estrógeno e da melatonina sobre o crescimento do tumor de Ehrlich e em ovários de camundongos Swiss fêmeas.

3.2 Específicos

- Induzir o desenvolvimento do tumor de Ehrlich no tecido subcutâneo de Camundongos Swiss;
- Observar a variação da área, diâmetro e massa do tumor quanto à ação do estrógeno e da melatonina;
- Calcular o crescimento e o percentual de inibição tumoral;
- Investigar a variação dos parâmetros morfométricos (área, perímetro e diâmetro), relação núcleo-citoplasma, das células presentes no tumor;
- Avaliar o número de células em mitose, apoptose e necrose presentes no tumor;
- Analisar histologicamente através de microscopia de luz, as alterações morfológicas dos ovários dos grupos experimentais;
- Analisar, através da microscopia de luz, a área ocupada pelos folículos ovarianos, corpos lúteos e vasos sanguíneos dos grupos experimentais;
- Analisar a taxa de sobrevivência dos grupos experimentais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e instalações

O experimento foi conduzido no Biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. Os animais foram mantidos em uma sala com piso e paredes revestidos em cerâmica, contendo 1 (um) condicionador de ar (12000 BTUs), 1 (um) exaustor e 2 (duas) lâmpadas fluorescentes, marca PHILIPS, de 40 W, as quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 400 lux. Este espaço foi lavado e sanitizado 10 (dez) dias antes da chegada dos animais com solução de hipoclorito de sódio (1%).

4.2 Manejo dos animais

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da UFRPE com o número 016921/2012. Foram utilizados 104 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), de 60 dias de idade, clinicamente saudáveis, oriundas do Biotério do Laboratório de Farmacologia - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal UFRPE. As mesmas foram pesadas e em seguida, alojadas em caixas plásticas, brancas, opacas e de dimensões padronizadas para a espécie (41x34x16 cm). As tampas, de grade de arame galvanizado com espaçamento entre arames de 7 mm, suporte para bebedouro e divisória escamoteável interna separando o bebedouro da ração. As caixas dos animais, tampas e bebedouros foram higienizados manualmente (após a retirada e descarte da cama usada) com detergente líquido e hipoclorito de sódio a 10%. Os animais foram alojados em uma densidade de cinco por gaiola e submetidos a ciclo claro/escuro (12/12 horas), considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas, em ambiente com temperatura controlada (22 °C) com água e alimentação *ad libitum*.

4.3 Delineamento experimental

Foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação da regularidade do ciclo estral dos camundongos. As amostras foram coletadas através de aste com algodão introduzida cuidadosamente na vagina. O material foi distribuído em lâminas, fixado em etanol a 95% e corado pelo método de Shorr-Harris para análise em microscópio óptico. Os animais que apresentaram ciclo estral regular foram

distribuídas em delineamento em blocos inteiramente casualizados (DBC), distribuídas em treze (13) tratamentos e 8 animais por unidade experimental (tab. 1).

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
Estrógeno e Melatonina	H	I
Estrógeno	J	K
Veículo do Estrógeno	L	M

O implante das células tumorais em todos os grupos experimentais procedeu-se ao 60º dia de experimento. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da variação da massa corpórea.

4.4 Pinealectomia

Os animais foram inicialmente pesados e, em seguida submetidos a uma anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina a 2% e cloridrato de cetamina a 10% administrado por via intramuscular nas doses de 15mg/kg e 50mg/kg respectivamente. Depois de anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia da região dorsal da cabeça com auxílio de uma lâmina de aço inoxidável. Posteriormente, foi realizada a antisepsia da região, com álcool iodado a 2%, e procedeu-se a realização de uma incisão de 20 milímetros sobre a linha média do osso parietal, estendendo para a crista sagital externa do intraparietal (crista do osso parietal). Após o afastamento da pele, foi feita a raspagem do periósteo expondo-se a sutura occipitointerparietal entre os ossos parietais e entre estes e a do osso interparietal. Com auxílio de um micromotor de baixa rotação, equipado com uma broca odontológica tronco cônica, de aço,

acoplada a um mandril, foi feita uma incisão circular, tomando como centro a calvaria (confluência das articulações dos ossos parietais entre si, e destes com o osso interparietal), de aproximadamente 4mm de diâmetro. Feita a craniotomia, o fragmento ósseo foi retirado e mantido sobre algodão umedecido em solução salina a 0,9%. Neste momento foi evidenciado, sob a dura-máter, o seio venoso longitudinal dorsal e transversal em forma de Y. Com fio de catgut 5-0 simples, foi feita dupla ligadura do seio longitudinal dorsal, 2 mm anteriormente à confluência dos seios longitudinal dorsal e transversal. Usando uma tesoura de íris foi feita uma secção entre as ligaduras. Para a hemostasia foi realizada uma compressão digital, utilizando gaze umedecida em solução salina a 0,9%. Neste momento a glândula pineal foi visibilizada, estando localizada abaixo da confluência dos seios longitudinal dorsal e transversal e entre os hemisférios cerebrais e o cerebelo. Com o auxílio de uma pinça, a glândula pineal foi pinçada e removida. Após estes procedimentos os seios venosos foram recolocados para a posição original, porém, sem realizar a anastomose. O fragmento da calota craniana foi então recolocado no lugar de origem e foi feita uma sutura na pele (fig. 4). Logo após o efeito anestésico, os animais voltaram a andar normalmente.

No pós-operatório os animais foram submetidos à antibioticoterapia (oxitetraciclina, 30mg/Kg, via intramuscular) durante 7 dias como medida profilática à instalação de encefalites decorrentes da exposição do encéfalo durante a pinealectomia. Além da antibioticoterapia se administrou analgésico (cetoprofeno, 10mg/Kg via subcutânea) durante 5 dias, no intuito de reduzir qualquer sensação algica decorrente do processo cirúrgico.

Após a retirada da pineal, esta foi fixada em líquido de BOUIN durante o período de 24 horas e processada para análise em 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.

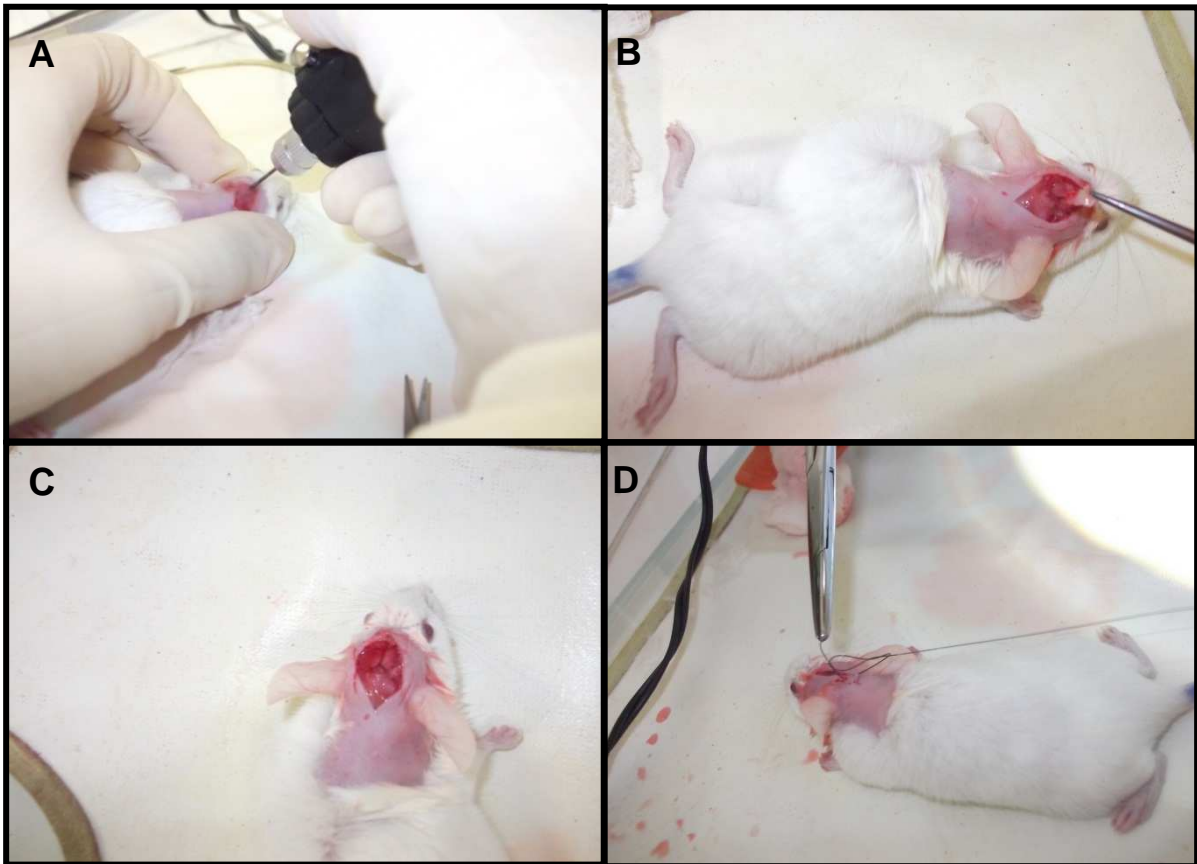


Figura 4. Realização da pinealectomia nos camundongos. (A) Incisão na calota craniana com auxílio de micromotor. (B) Retirada do fragmento ósseo. (C) Evidenciação do seio venoso longitudinal dorsal e transversal em forma de Y. (D) Sutura realizada após a retirada da pineal.

4.5 Tumor experimental

Para a realização do protocolo experimental foi utilizado o tumor de Ehrlich, adenocarcinoma espontâneo de glândula mamária de camundongos fêmeas, isolado no final do século XIX e descrito em 1905 por Paul Ehrlich (EHRlich e APOLANT, 1905). Esse tumor apresenta a característica de se desenvolver em qualquer linhagem de camundongos, de não regredir espontaneamente (SIGIURA, 1965), e ter rápido crescimento que restringe o tempo de experimento (SILVA; FECCHIO; BARRAVIERA, 1997). O crescimento do tumor de Ehrlich é definido pela dose de células implantadas, o que permite certo grau de controle (SAAD-HOSSNE, 2002). O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos (MATSUZAKI *et al.*, 2003) e cresce na forma ascítica quando inoculado por via intraperitoneal (BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO, 2004).

O tumor utilizado foi proveniente do Laboratório de Farmacologia - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. A manutenção das células tumorais foi realizada através de repiques semanais do fluido ascítico *in vivo*, na qual $1,02 \times 10^6$ células tumorais em um volume de 0,2 ml foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos receptores a cada 7 dias.

Para a inoculação das células tumorais nos animais dos grupos experimentais, foram retirados 3,0 ml de fluido ascítico, por punção, de um camundongo pré-inoculado a 8 dias com o tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. Esse fluido foi centrifugado até a obtenção de um líquido denso e claro, correspondente a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias. Foi realizada então, a lavagem, contagem e teste de viabilidade das células tumorais. Foram empregadas somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%. A fórmula para determinação do número de células viáveis foi deduzida segundo Guerra (2002). Os animais receberam uma injeção subcutânea na região axilar de 0,05ml da suspensão celular, contendo $2,5 \times 10^6$ células tumorais, para obtenção do tumor na forma sólida (fig. 5).



Figura 5. Esquema de reprodução do tumor de Ehrlich sólido (Adaptado de FERREIRA, 2005).

Uma vez iniciado o desenvolvimento dos tumores, os animais foram pesados diariamente.

4.6 Administração da melatonina e do estrógeno

A melatonina foi administrada durante 60 dias antes da implantação do tumor e 12 dias após o implante tumoral (nos grupos A, B, H e I), na dose de 200 µg por 100 g de peso corporal, entre o período das 18:00 às 19:00 horas (PRATA-LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004), por via subcutânea. A solução de melatonina foi preparada dissolvendo-se a melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis,

Mo., USA) em 0,1ml de NaCl contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu injeções diárias de 0,1ml do veículo (REDINS; REDINS; NOVAES, 2000).

O benzoato de estradiol foi administrado diariamente durante o mesmo tempo que a melatonina (nos grupos H, I, J e K), por via subcutânea, na dose de 20 µg/kg. O benzoato de estradiol foi dissolvido em óleo de amendoim estéril, que é o veículo original do produto, de tal forma que a dosagem está contida em 0,1ml da solução (VICELLI; GURGEL; ALVARENGA, 2006).

4.7 Cálculo do crescimento tumoral

Foram realizadas medidas diárias dos diâmetros do tumor a partir do quinto dia após a inoculação das células tumorais, onde os animais tiveram suas peles estendidas na região abdominal para facilitar a visualização do nódulo e também auxiliar na medida do mesmo com o auxílio de paquímetro (fig. 6).

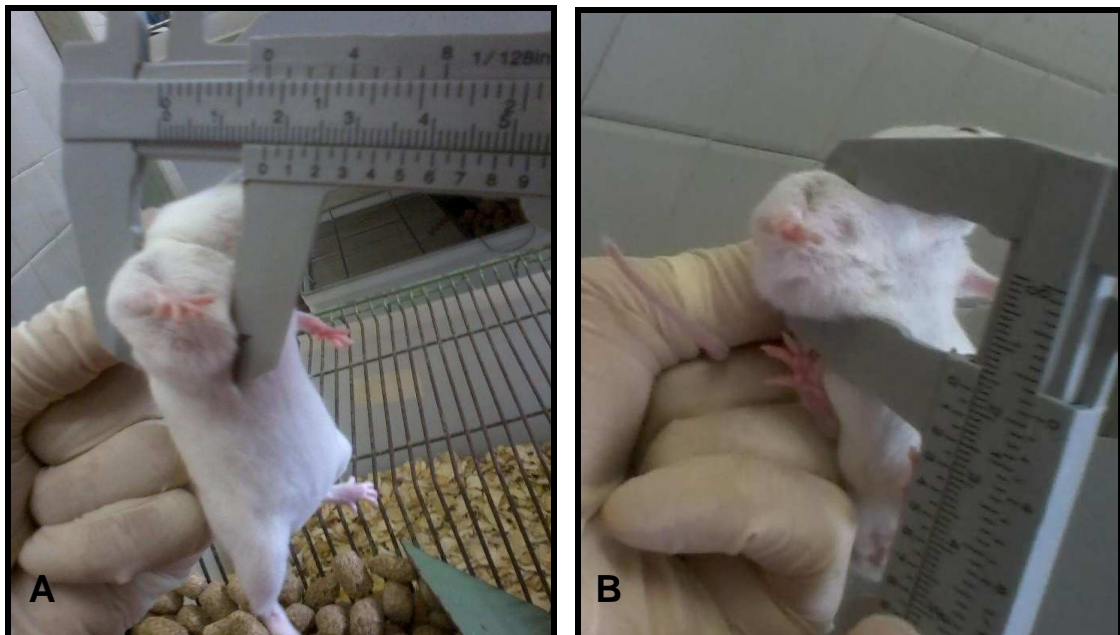


Figura 6. Medidas dos diâmetros do tumor. (A) Diâmetro horizontal. (B) Diâmetro vertical.

O cálculo do volume do tumor foi realizado mediante a 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 em seus três planos perpendiculares (GUO *et al.*, 2005; BOURSOT, 2009).

4.8 Percentual de inibição tumoral

O percentual de inibição tumoral foi calculado no 12º dia após a inoculação do tumor. Os animais foram eutanasiados e os tumores foram coletados e pesados. A equação utilizada foi: % Inibição Tumoral = $(C - T)/C \times 100\%$, onde C = peso médio dos tumores dos grupos controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados melatonina (SOUSA *et al.*, 2010).

4.9 Análise de sobrevida

Para a determinação da sobrevida, os animais inoculados com o tumor de Ehrlich dos grupos experimentais foram observados diariamente, durante o período de 12 dias. A partir desse monitoramento, foram feitos o registro da mortalidade diária e posteriormente, calculada a taxa e a percentagem média de sobrevida (QURESHI *et al.*, 2001). Para tal, foi utilizado o método atuarial para dados incompletos (LEE, 1992; SELVIN, 1996), no qual é calculado as probabilidades de sobrevida em intervalos fixados previamente, e o número dos expostos a risco corresponde aos pacientes vivos ao início de cada intervalo x . O número de expostos (l_x) é ajustado de acordo com o número de censuras que ocorreram neste período, na suposição de que as censuras ocorreram uniformemente durante o período x e que a experiência subsequente dos casos censurados é a mesma daqueles que permanecem em observação (KAHN e SEMPOS, 1989). Assim, na presença de censura, é feito um ajuste no número de pessoas expostas ao risco no início do período x , subtraindo-se metade das censuras do total de expostos ao risco no início do período, supondo-se que estes indivíduos estiveram, em média, expostos ao risco apenas metade do intervalo de seguimento (SZKLO e NIETO, 2000). Nessa tábua de vida, o tempo também é dividido em intervalos fixos e a probabilidade de óbito (q_x) e a de sobrevida (p_j) é calculada para cada um dos intervalos. Tem-se então:

$(q_x = d_x/l^*)$, $(p_x = 1 - q_x)$ e $l^*_x = l_x - w_x/2$, onde:

q_x = probabilidade condicional de morte no intervalo x ;

p_x = probabilidade condicional de sobrevida no intervalo x ;

l^*_x = o número de expostos ao risco, no intervalo x , corrigidos de acordo com a censura;

l_x = número de pessoas expostas ao risco no início do período;

w_x = número de pessoas perdidas de observação no intervalo x .

Para avaliar se a diferença obtida entre os grupos foi estatisticamente significativa, ou seja, se é provável que se deva a efeitos aleatórios, utilizou-se tal como na análise “clássica” o valor de p ou intervalo de confiança (BOTELHO, 2008). Para calcular o valor de p na análise de sobrevivência, o teste de significância utilizado foi o de Log-rank.

4.10 Coleta do material biológico

Após 12 dias do implante do tumor, foram coletados os ovários e a massa tumoral dos animais experimentais. Para isso utilizou-se o hidrócloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular. Em seguida foi realizada a abertura da cavidade abdominal desde o púbis até o rebordo das costelas para a retirada dos ovários e do tumor, os quais foram fixados em glutaraldeído tamponado a 10%, permanecendo no mesmo por 48 horas.

4.11 Microscopia de Luz

Posteriormente a fixação dos ovários e da massa tumoral, os mesmos foram processados pelos procedimentos de rotina para inclusão em resina nos Laboratórios de Histologia do DMFA/UFRPE e Laboratório de Microscopia do CENAPESQ/UFRPE.

Após a inclusão em resina, o material foi cortado em micrótomos apropriados, ajustado para 1 µm, utilizando-se navalhas de vidro previamente preparadas. Os cortes histológicos foram corados pela técnica da Hematoxilina/Floxina e observados em Microscópio de luz.

4.12 Análise histopatológica

Todas as lâminas dos tumores foram revistas para o estudo histopatológico. Nesta avaliação, levou-se em consideração à observação de atividade mitótica, pontos de necrose, infiltrados inflamatórios, índice apoptótico, células gigantes, pleomorfismo nuclear e áreas com edema.

4.13 Análise morfométrica

Para o estudo morfométrico foi efetuada a captura e digitalização de imagens com o auxílio de um programa de análise gráfica por computador, Motic Images Plus 2.0. Descritores de formas, tais como perímetro, área e diâmetro têm sido usados na literatura especializada para descrever quantitativamente formas de estruturas biológicas e aqui foram usados para determinação do perímetro, área e diâmetro dos núcleos das células tumorais- pleomorfismo. Para isso foram escolhidos campos microscópicos no aumento de 400x, evitando-se áreas de necrose e ou infiltrado intenso (COTRIM *et al.*, 1990; TALVE; COLLAN; EKFOR, 1996). De cada tumor foram capturadas 15 imagens, das quais 30 núcleos aleatórios foram delimitados.

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 com 100 pontos (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966). Foram contados seis campos aleatórios e em sentido horário, por lâmina, totalizando 600 pontos em cada lâmina.

4.14 Análise estatística

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

5. REFERÊNCIAS

- ADASHI EY. The ovarian life cycle. In: YEN, S. S. C.; JAFFE, R.B. **Reproductive Endocrinology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. p. 202 – 204.
- ALBERT, C; PRADE, M; BOHMON, C. Effect of Pinealectomy on the Melanic Tumors of the Golden Hamster Induced by Administration of a Single Dose of 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene. **Comptes Rendus**, v. 27, p. 2465-2468, 1970.
- ANDERSON, E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, v. 4, p. 197-201, 2002.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n.3, p. 1269-130, 2001.
- ASSAYED, M. E.; ABD EL-ATY, A. M. Protection of rat chromosomes by melatonin against gamma irradiation induced damage. **Mutation Research**, v. 677, p.14–20, 2009.
- ASTE, N.; COZZI, B.; STANKOV, B.; PANZICA, G. Sexual differences and effect of photoperiod on melatonin receptor in avian brain. **Microscopy Research and Technique**, v. 55, n. 1, p. 37 – 47, 2001.
- AXELROD, J.; WURTMAN, R. J.; WINGET, C. M. Melatonin synthesis in the hen pineal gland and its control by light. **Reprinted from Nature**, v. 201, n 4924, p.1134, 1964.
- BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. Mammalian Pineal melatonin: a clock for all seasons. **Experientia**, v. 45, p. 946-954, 1989.
- BENSON, B.; MATTHEWS, M. J.; HADLEY, M. E.; POWERS, S.; HRUBY, V. J. Differential localization of antigonadotropic and vasotocic activities in bovine and rat pineal. **Life Science**, v. 19: p. 747-754, 1976.
- BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J. A. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Science**, v. 75, n. 2, p. 245-255, 2004.
- BINDONI, M; JUTISZ, M.; RIBOT, G. Characterization and partial purification of a substance in the pineal gland which inhibits cell multiplication in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v. 437, n. 2, p. 577-88, 1976.
- BLASK, D. E.; DAUCHY, R. T.; SAUER, L. A. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. **International Journal of Basic and Clinical Endocrinology**, v. 27, n. 2, p.179–188, 2005.
- BLASK, D. E.; HILL, S. M. Effects of melatonin on cancer: Studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. **Journal of Neural Transmission**, v. 21, p. 433-449, 1986.

BLASK, D. E. Melatonin in oncology. In: YU, H.S.; REITER, R. J. **Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications** Boca Raton: CRC Press, 1993, p. 448-464.

BLASK, D. E.; SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T.; HOLOWACHUK, E. W.; RUHOFF, M. S.; KOPFF, H. S. Melatonin inhibition of cancer growth *in vivo* involves suppression of tumor fatty acid metabolism via melatonin receptor-mediated signal transduction events. **Cancer Research**, v. 59, n. 18, p. 4693-4701, 1999.

BLASK, D. E.; SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T. Melatonin is a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 113-132, 2002.

BOTELHO, F.; SILVA, C.; CRUZ, F. Epidemiologia explicada. O valor de prova (p). **Acta Urológica**, v. 25, n. 3, p. 55-7.

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 en vue d'un traitement par radiothérapie. **Médecine Nucléaire**, v. 33, p. 440–449, 2009.

BOUTIN, J. A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n.8, p. 412-419, 2005.

BOUTIN, J. A.; MARCHETEAU, E.; HENNIG, P.; MOULHARAT, N.; BERGER, S.; DELAGRANGE, P.; BOUCHET, J. P.; FERRY, G. MT3/QR2 melatonin binding site does not use melatonin as a substrate or a co-substrate. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 4, p. 524–531, 2008.

BULUN, S. E.; ADASHI, E. Y. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. **Williams Textbook of Endocrinology**. 11 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2003, p. 541-614.

CAGNACCI, A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. **Journal of Pineal Research**, v. 21, n. 4, p. 200 – 213, 1996.

CARLBERG, C. Gene regulation by melatonin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 387–96, 2000.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P. LARDONE, P. J.; GARCIA, M. S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role intracrine, autocrine, and/ or paracrine substance. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 3, p. 537- 539, 2004.

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

CATT, K. J.; DAFAU, M. L. Gonadotropic hormones: biosynthesis, secretion, receptors, and actions. In: Yen, S. S. C.; Jaffe, R. B. **Reproductive endocrinology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991, p. 144 – 51.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal: fisiologia celular e função. In: WAJCHENBERG, B. L. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Roca, 1992, p. 83–93.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

COLLINS, A.; YUAN, L. KIEFER, T. L.; CHENG, Q.; LAI, L.; HILL, S. M. Over expression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice. **Cancer Lettrs**, v. 189, n. 1, p. 49-57, 2003.

COMMENTZ, J. C.; HELMKE, K. Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. **Hormone Research**, v. 44, n. 6, p. 271-275, 1995.

COS, S.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Melatonin and mammary pathological growth. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 21, n. 2, p.133–170. 2000.

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

COTRIM, A. E. I.; PARDI, P. C.; SAKUMOTO, S. Morfometria e estereologia. Algumas considerações gerais. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 5, p. 28-30, 1990.

CUZZOCREA, S.; REITER, R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, v.426, n.1-2, p.1-10, 2001.

DAIR, E. L; SIMOES, R. S.; SIMÕES, M. J.; ROMEU, L. R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 5, p. 1299-1305, 2008.

DAS GUPTA, T. K.; TERZ, J. Influence of Pineal Gland on the Growth and Spread of Melanoma in Hamsters. **Cancer Research**, v. 27, p. 1306-1311, 1967.

DE NARDI, A. B. **Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, P53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 92p. Tese de doutorado (Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2007.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, 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**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DENG, C.; BRODIE, S. G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 5, p. 387-394, 2001.

DÍAZ, L. B.; DÍAZ, R. E.; URQUIJO, C.; FERNÁNDEZ, A. C. Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1057, p. 337-364, 2005.

DOS REYS, L. L. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **Revista Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 6, p. 213-225, 2001.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **International Journal of Basic and Clinical Endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.

DUBOCOVICH, M. L.; RIVERA-BERMUDEZ, M. A.; GERDIN, M. J.; MASANA, M. I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 8, n. 10, p. 1093-1108, 2003.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Maus-tumoren. **Berlin Klin Wochenschr**, v. 28, p. 871-874, 1905.

FALCÓN, J.; BESSEAU, L.; SAUZET, S.; BOEUF, G. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM**, v. 18, n. 2, p. 81-88, 2007.

FERREIRA, E. **Desenvolvimento do tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas ou não castradas induzidas ao hipertireoidismo**. 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005.

FILARDO, E. J.; GRAEBER, C. T.; QUINN, J. A.; RESNICK, M. B.; GIRI, D.; DELELLIS, R. A.; STEINHOFF, M. M.; SABO, E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinic pathologic determinants of tumor progression. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 6359-6366, 2006.

FRANKLIN, H.; EPSTEIN, M. D.; AMNON, B. M.D. Mechanisms of Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 3, p. 186-195, 1997.

FUQUA, S. A.; SCHIFF, R.; PARRA, I.; FRIEDRICH, W. E.; SU, J. L.; MCKEE, D. D.; SLENTZ-KESLER, K.; MOORE, L. B.; WILLSON, T. M.; MOORE, J. T. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 59, n. 5, p. 425-5428, 1999.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHNEEBERGER, C.; HUBER, J. C. production and action of estrogens. **New England journal of medicine**, v. 346, n. 5, p. 340-351, 2002.

GUERRA, J. L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. **Fitoterapia**, v. 73, p. 730-733, 2002.

GUO, Z. ZHANG, T.; LI, X.; WANG, O.; XU, J.; YU, H.; ZHU, J.; WANG, H.; WANG, C.; TOPOL, J. E.; WANG, Q.; RAO, S. Towards precise classification of cancers based on robust gene functional expression profiles. **BMC Bioinformatic**, v. 6, n. 1, p. 58, 2005.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, 864p.

HARDELAND, R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. **Biofactors**, v. 35, n.2, p. 183–192, 2009.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. The Melatonin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p.313-316, 2006.

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; REDDY, A. B. Two decades of circadian time. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 5, p. 812–819, 2008.

HEDLUND, S. C. Cirurgia dos sistemas reprodutivos e genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2002, p. 251-256.

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**, v. 48, p. 6121-6126, 1988.

HILL, S. M.; BLASK, D. E. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. **Cancer Letters**, v. 64, p. 249-256, 1992.

HILL, S. M.; FRASCH, T.; XIANG, S.; YUAN, L.; DUPLESSIS, T.; MAO, L. Molecular Mechanisms of Melatonin Anticancer Effects. **Integrative Cancer Therapies**, v. 8, n.4, p. 337-346, 2009.

HISSA, M. N.; LIMA, G. G.; SIMÕES, J. C.; NUNES, R. T. L. melatonina e a glândula pineal. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 4, p. 1-10, 2008.

HOFFMAN, J. C.; CULLIN, A. M. Effects of pinealectomy and constant light on the estrous cycles of female rats. **Journal of Endocrinology**, v. 17, n. 2, p. 167-74, 1975.

JOHNSON, C. A. “Distúrbios da glândula mamária”. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4. ed. Editora: Mosby Elsevier, 2006, p. 847-848.

JOHNSTON, S. D. Reproductive systems. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1993, v. 2, p. 2177-2199

JUNG, B.; AHMAD, N. Melatonin in Cancer Management: Progress and Promise. **Cancer Research**, v. 66, p. 9789-9793, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KAHN, H. A.; SEMPOS, C. T. **Statistical Methods in Epidemiology**. New York/Oxford: Oxford University Press. 1989.

KAPPERS, J. A. The development topographical relation and innervation of epiphysis cerebri in the albino rat. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 52, n. 2, p. 163-215,1960.

KARBOWNIK, M.; REITER, R. J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, n. 1, p. 9-22, 2000.

KATO, K.; HIRAI, K.; NISHIYAMA, K.; UCHIKAWA, O.; FUKATSU, K.; OHKAWA, S., KAWAMATA, Y.; HINUMA, S.; MIYAMOTO, M. Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 2, p. 301–310, 2005.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; CHOI, I.; DELAGE-MOURROUX, R.; EDIGER, T. R.; MARTINI, P. G.; MONTANO, M.; SUN, J.; WEIS. K.; KATZENELLENBOGEN, J. A. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 279–285, 2000.

KENDALL, B.; ESRON, R. Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. **Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p.103-123, 2002.

KIEFER, T. L.; LAI, L.; YUAN, L.; DONG, C.; BUROW, M. E.; HILL, S.M. Differential regulation of estrogen receptor-alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor-alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 4, p. 231–239, 2005.

KODAMA, M.; KODAMA, T. Statistical analysis of hormonal effects on the steroid responsiveness of solid Ehrlich tumors. **Cancer Research**, v. 30, p. 228-235, 1970.

KRISHNAN, V.; HEATH, H.; BRYANT, U.H. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. **Vitamins and Hormones**, v. 60, p.123-147, 2001.

KUIPER, G. G.; SHUGHRUE, P. J.; MERCHENTHALER, I.; GUSTAFSSON, J. A. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 19, p. 253–286, 1998.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. **Pathologic Basis of Disease**. 7^a ed. Pennsylvania: Elsevier Health Sciences, 2004, p. 288-325.

LANGER, M.; HARTMANN, J.; TURKOF, H.; WALDHAUSER, F. Melatonin in the human—an overview. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 109, n. 18, p. 707-713, 1997.

LANOIX, D.; BEGHDADI, H.; LAFOND, J.; VAILLANCOURT, C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 1, p. 50-60, 2008.

LEE, C. O. Complementary and alternative medicines patients are talking about: melatonin. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v.10, n.1, p. 105–107, 2006.

LEE, D. S.; LEE, S. H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. **FEBS Letters**, v. 501, n. 1, p. 84-86, 2001.

LEE, E. T. **Statistical Methods for Survival Data Analysis**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons. 1992.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, Y.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 2, p. 2587, 1958.

LEWY, A. J. Biochemistry and regulation of mammalian melatonin production. In: Relkin, R. The pineal gland. **New york: Elsevier Biomedical**, p. 77- 128,1983.

LISSONI, P.; PAOLOROSSO, F.; TANCINI, G.; BARNI, S.;ARDIZZOIA, A.; BRIVIO, F.; ZUBELEWICZ, B.; CHATIKHINE, V. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? **European Journal of Cancer** . 1996, v. 32, n. 8, p. 1340-1343.

LUNENFELD, B. Endocrinology of the aging male. **Minerva Ginecologica**, v. 58, n. 2, p. 153-170, 2006.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 25, n. 3-4, p. 177-195, 2004.

MACEWEN, E.G.; WITHROW, S.J.; Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2^a ed. Philadelphia : Saunders, 1996, p.356- 372.

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**, v. 54, n. 3, p. 267-271, 2008.

MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 4, p. 336 – 347, 2001.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHIITQ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Molecular and Cellular Biology**, v.83, n.6, p.835-839, 1995.

MARKUS, R. P.; CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C.; LOTUFO, C. M. C.; BARBOSA, E. M.; FERREIRA, Z. S. Glândula pineal e Melatonina. In: MENNA-BARRETO, L. S.; MARQUES, N. (Org.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003, p. 191-222.

MARONDE, E.; STEHLE, J. The mammalian pineal gland:Known facts, unknown facets. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 4, p.142–149, 2007.

MARTINEZ-CAMPA, C.; GONZÁLEZ, A.; MEDIAVILLA, M. D.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J.; COS, S. Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 94, n. 3, p. 249-254, 2005.

MARTINS, E.; FERREIRA, A. C. F.; SKORUPA, A. L.; AFECHE, S. C.; CIPOLLANETO, J.; COSTA, R. L. F. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 6, p. 1116 – 1121, 2004.

MARTINS, N. V.; FOCCHI, J. Citologia funcional. In: LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. **Ginecologia Endócrina**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, p. 423-427, 1995.

MARTIN, V.; HERRERA, F.; CARRERA-GONZALEZ, P.; GARCÍA-SANTOS, G.; ANTOLÍN, I.; RODRIGUEZ-BLANCO, J.; RODRIGUEZ, C. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 1081–1088, 2006.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; GORMIAK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Effect of *Paffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascit form. **Life Sciences**, v. 74, p. 573 – 579, 2003.

MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State: Universidade. California, 788 p, 2002.

MILLS, E.; WU, P.; SEELY, D.; GUYATT, G. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. **Journal of Pineal Research**; v.39, p. 360–366, 2005.

MORALES-VÁZQUEZ, F. Estrategias clínicas y Desarrollo de las Bases Científicas en el Empleo de Hormonoterapia para Cáncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 1, p.163-175, 2006.

MOORE, R. Y.; HELLER, A.; BHATNAGER, R. K.; WURTMAN, R. J, AXELROD J. Central control of the pineal gland: Visual pathways. **Archives of Neurology**, v. 18, n. 2, p. 208-218, 1968.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J. M.; BOSTOCK, D. E.; FARREL, E. Effect ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. **The Veterinary Record**, v. 142, n. 24, p. 656-658, 1998.

MORRISON, W. B. 1998. Canine and feline mammary tumors. In: Morrison W.B. (Ed). **Cancer in dogs and cats** – medical and surgical management. Baltimore: Williams ; Wilkins, cap. 39, p. 591 – 598.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, 1990, cap.12, p.518-552.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v.80, n. 4, p.1012–1016, 2003.

- NILSSON, S.; MÄKELÄ, S.; TREUTER, E.; TJUANGE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK, E.; PETTERSSON, K.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Mechanisms of estrogen action. **Physiological Reviews**, v. 81, n.4, p.1535-1565, 2001.
- NOSJEAN, O.; NICOLAS, J. P.; KLUPSCH, F. DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J. A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 1369-1379, 2001.
- OLIVEIRA, L. O. ; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p.105-110, 2003.
- ORTIZ-LOPEZ, L.; MORALES-MULIA, S.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. BENITEZ-KING, G. ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 1, p. 15–21, 2009.
- PALERMO-NETO, J.; MASSOCO. C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**, v. 17, p. 43-54, 2003.
- PANDA, S.; NAYAK, S. K.; COMPO, B.; WALKER, J. R.; HOGENESCH, J. B.; JEGLA, T. Illumination of the melanopsin signaling pathway. **Scientific Monthly**, v. 307, p. 600–604, 2005.
- PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.
- PERSSON, I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers – evidence and hypotheses from epidemiological findings. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 357-364, 2000.
- PIRES, M. A.; TRAVASSOS, F. S.; PIRES, I. Neoplasias em canídeos – Um estudo descritivo de 6 anos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 98, n. 547, p.111-118, 2003.
- PRATA-LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonina on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 987-995, 2004.
- PRESLOCK, J. P. The pineal gland: basic implications and clinical correlations. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 2, p. 282-308, 1984.
- QIU, X.; KUMBALASIRI, T.; CARLSON, S. M.; WONG, K. Y.; KRISHNA, V.; PROVENCIO, I.; BERSON, D.M. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. **Nature International Weekly Journal of Science**, v. 433, p. 745–749, 2005.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. In: **Congresso de ciências veterinárias**. Oeiras, 2002, p. 183-190.

QUAY, W. B. Volumetric and cytologic variation in the pineal body of *Peromyscus leucopus* (Rodentia) with respect to sex, captivity and daylength. **International Journal of Morphology**, v. 98, p. 471–495, 1956

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.

RAPHAEL, J. W. Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 118-30. 2002.

RAM, P. T.; KIEFER, T.; SILVERMAN, M.; SONG, Y.; BROWN, G.M.; HILL, S. M. Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 141, p. 53-64, 1998.

RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; LEVIN, E. R. Plasma membrane estrogen receptors signal to anti-apoptosis in breast cancer. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 1434–1447, 2000.

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**, v. 61, n. 4, p. 679-684, 2000.

REICH, O; REGAUER, S., URDI, W. LAHOUSEN, M., WINTER, R. Expression of oestrogen and progesterone receptor in low-grade endometrial stromal sarcomas. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 5, p. 1030-1034, 2000.

REICHLIN, S.; NEUREICHLIN, S. Neuroendocrinology. In: Willians Textbook of Endocrinology, ed. Wilson, J. D.; FOSTER, D. W.; SAUNDERS, W. B. **Philadelphia**. 8. ed. cap. 5, p. 135 - 219,1992.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. HORMÔNIOS SEXUAIS ESTRÓGENOS: CONTAMINANTES BIOATIVOS. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

REITER, R. J.; JOHNSON, L. Y.; VAUGHAN, M. K.; RICHARDSON, B. A . Pineal constituents and reproductive physiology. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 74, n. 2, p. 163-178, 1981.

REITER, R. J.; MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E.; POEGGELER, B.; BARLOW-WALDEN, L.; CHUANG, J.; ORTIZ, G. G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. **Journal of Pineal Research**, v. 18, p. 1-11, 1995.

REITER, R. J.; ROBINSON, J. **Melatonina**. Rio de Janeiro: Editora Record, 1996.

REITER, R. J.; ROBINSON, J. **Melatonin: your body's natural wonder drug**. New York: Bantam Books; 1995.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in Brain Research**, v. 181, p. 127-151, 2010.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; KORKMAZ, A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: Possible impact on hypertension. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 27, n. 6, p.17–20, 2009.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular luimelatonin concentration. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, n.2, p. 492-496, 1990.

RUBANYI, G. M.; JOHNS, A.; KAUSER, K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 89-98, 2002.

RUTTEMAN, G. R.; KIRPENSTEIJN, J. Tumours of Mammary Glands. In: DOBSON, J. M.; LASCELLES, B.D. **Manual of Canine and Feline Oncology**. 2. ed. England : BSAVA, p. 234-239, 2003.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2001, p. 455-477.

SAAD-HOSSNE, R. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho. Implantação do modelo no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 208-215, 2002.

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

SELVIN, S. **Statistical Analysis of Epidemiologic Data**. 2 ed. New York/Oxford: Oxford University Press. 1996.

SHIU, S. Y. Toward rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2007.

SIGIURA, K. Tumor transplantation. In: GRAY, W.I. **Methods of Animal Experimentation**. New York: Academic Press, v. 2, p.171-222, 1965.

SILVA, A. E. **O efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, UFMG, Minas Gerais, 2003.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

SILVA, R. J.; FECCHIO, D.; BARRAVIERA, B. Effect of *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) venom on the evolution of Ehrlich ascites tumor. **Journal Of**

Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, v. 3, p. 324-341, 1997.

SIMKO, F.; PECHANOVA, O. Potential roles of melatonin and chronotherapy among the new trends in hypertension treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n.2, p.127–133, 2009.

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

SLIWINSKI, T.; ROSEJ, W.; MORAWIEC-BAIDA, A.; MORAWIEC, Z.; REITER, R. J.; BLASIAK, J. Protective action of melatonin against oxidative damage: Chemical inactivation versus base-excision repair. **Mutation Research**, v. 634, n. 1–2, p. 220–227, 2007.

SOARES Jr., J. M.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, A. C. Aspectos moleculares dos receptores de melatonina e sua ação na reprodução. **Femina**, v. 31, n. 6, p. 495-500, 2003.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos editora S.A., 2000.

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* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Retrospective study on 761 canine skin tumors. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-60, 2006.

SPEIRS, V.; KERIN, M. J. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. **Breast Cancer**, v. 87, p. 405-409, 2000.

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**, v. 108, p. 339-350, 2008.

SUH, K. S.; KOH, G.; PARK, C. Y.; WOO, J. T.; KIM, S. W.; KIM, J. W.; PARK, I. K.; KIM, Y. S. Soybean inhibit tumor necrosis factor α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. **Phytochemistry Reviews**, v. 63, p. 209-215, 2003.

SZKLO, M.; NIETO, F. J. **Epidemiology: Beyond the Basics**. Annapolis: Aspen Publishers. 2000.

TALVE, L. A. I.; COLLAN, Y. U. I.; EKFORSS, T. O. Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferation activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. **Journal Cutaneous Pathology**, v. 23, p. 335-343, 1996.

TAMARKIN, L.; COHEN, M.; ROSELLE, D.; REICHERT, C.; LIPPMAN, M.; CHABNER, B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. **Cancer Research**, v. 41, p. 4432-4436, 1981.

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**, v. 92, n.1, p.328–343, 2009.

TATEYAMA, S.; COTCHIN, E. Alkaline phosphatase reaction of canine mammary mixed tumours: a light and electron microscopic study. **Research in Veterinary Science**, v.23, p. 356–364, 1977.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, v.78, n. 3, p. 687-721, 1998.

VICELLI, T. J.; GURGEL, M. S. C.; ALVARENGA, M. Histologia mamária após o uso de esteroides sexuais – estudo em ratas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 369-374, 2006.

VIJAYALAXMI, T. C. R.; REITER, R. J.; HERMAN, T. S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 2, p. 575–601, 2002.

VILLALOBOS, A.; KAPLAN, L. **Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring the Human-Animal Bond**. 1. ed. Ames: Blackwell Publishing, p. 89-102, 2007.

VOLLRATH, L. **Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen**. New York: Spriger-Verlag, 1981.

VORHERR, H. Endocrinology of breast cancer. **Maturitas**, v. 9, p.113-122, 1987.

WANG, H.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract on the rat during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1331-1340, 2000.

WANKE, M. M.; GOBELLO, C. Ciclo estral canino. In: WANKE, M. M. ; GOBELLO, C. **Reproducción en caninos y felinos domésticos**. Buenos Aires: Intermédica editorial, p.1-10, 2006.

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

WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. **Williams textbook of endocrinology**. 9^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998, p.1819.

WINSTON, M.; JOHNSON, E.; KELLEHER, J. K.; BANERJEE, S.; MARGULIS, L. Cellular effects on live stentors correlated with the inhibition of colchicine-binding to microtubule protein. **Cytobios**, v. 9, n.36, p.237-43, 1974.

WITEK, A.; SKALBA, P.; PAUL, M.; GRANICZKA, M.; MAZUREK, U.; CHROMY, G.; WILCZOK, T. Evaluation of wild-type estrogen receptor beta and its isoforms: ER-beta/delta 5/6 i ER-beta/delta 6 in endometrial adenocarcinoma. **Ginekologia Polska**, v. 74, p. 897-902, 2003.

WITHROW, S. J. Why worry about cancer in pets? In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2007, p.15-17.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J.; PHILLIPS, L. S. Melatonin synthesis in the pineal gland: Control by light. **Science**, n. 142, p. 1071-1073, 1963.

ZUCCARI, D. A.; CAMPOS, P.; SANTANA, A. E.; ROCHA, SOUSA, N. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadela – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n. 32, p. 50-5, 2001.

Atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de Ehrlich implantado em camundongos Swiss¹

Danielle Dutra Pereira & Joaquim Evêncio-Neto

ABSTRACT- The aim of this study was to evaluate the antitumor activity of melatonin on the Ehrlich tumor in female Swiss mice, through its interaction with the reproductive system. For this purpose we used 56 female Swiss mice (*Mus musculus*), 60 days of age, were divided into seven 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. Ovarian changes were 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. As to Ehrlich tumor, the pinealectomized animals had higher rate of tumor growth than animals melatonin treated, the last having also presented a percent inhibition of the tumor. 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, may predispose organisms to a higher incidence of tumor.

INDEX TERMS: Estrogen, melatonin, pinealectomy, tumor.

RESUMO- O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de Ehrlich em camundongos fêmeas Swiss, através de sua interação com o aparelho reprodutor. Para tanto 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. Alterações ovarianas foram significativas entre os grupos, observando-se um aumento no peso dos ovários e no número de folículos dos animais pinealectomizados, enquanto que os animais sham-pinealectomizados apresentaram um maior número de corpos lúteos. Quanto ao tumor de Ehrlich, os animais pinealectomizados apresentaram maior taxa de

crescimento tumoral que os animais tratados com melatonina, tendo os últimos apresentado também uma percentagem de inibição tumoral. 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. Podendo-se conjecturar que eventuais alterações nos padrões de ritmicidade endógena para a melatonina, pode predispor os organismos à uma maior incidência de tumor.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estrógeno, melatonina, pinealectomia, tumor.

INTRODUÇÃO

O interesse na obtenção de conhecimentos mais específicos sobre tumores de mama na espécie canina vem crescendo devido à frequência na ocorrência desse tipo de tumor subjacente ao diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (Cavalcanti & Cassali 2006). Nesta espécie, representa a segunda neoplasia mais observada, excedida apenas pelas neoplasias cutâneas. No entanto, quando consideradas somente as fêmeas, é o tipo de tumor de maior ocorrência (De Nardi et al. 2002).

A observação de que o crescimento das neoplasias mamárias é regulado pelos estrógenos tem tido um impacto fundamental na abordagem terapêutica desse grupo de tumores (Cote & Taylor 1994). Na busca pela inibição do crescimento tumoral, observou-se que a melatonina tem requisitos para ser considerada fármaco antiestrogênico, podendo controlar a produção de hormônios gonadais, levando a um efeito inibitório sobre tumores hormônio-dependentes e limitando a capacidade metastática de células (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 folículo estimulante (FSH) e, conseqüentemente, reduzindo a produção ovariana de estradiol. Dessa forma se reduz a resposta mitogênica do tumor ao estradiol, o que pode explicar os efeitos protetores do hormônio neste tipo de patologia (Blask & Hill 1986).

Em virtude de similaridades biológicas com as neoplasias mamárias caninas, tumores experimentais transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, têm despertado o interesse de pesquisadores para empregá-los como modelo comparativo para o estudo desta patologia. A vantagem de estudar o tumor de Ehrlich está no conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas, além

do desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (Palermo-Neto 2003). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral da melatonina sobre o tumor de Ehrlich em camundongos fêmeas Swiss, através de sua interação com o aparelho reprodutor.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com o número 016921/2012.

Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*) de 60 dias de idade, 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 contínuo de 12h/dia, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas, utilizando lâmpada fluorescente, luz do dia, de 40 W. A temperatura da sala foi ajustada para 22 ± 2 °C.

Os camundongos foram distribuídos em delineamento em blocos inteiramente casualizados (DBC), sete tratamentos e oito animais por unidade experimental (Quadro 1). A pinealectomia foi realizada segundo o método preconizado por Maganhin et al. (2009a), na qual os animais foram inicialmente anestesiados com cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg), via intramuscular. Sob efeito do anestésico, realizou-se a tricotomia da região dorsal do crânio. Em seguida, foi realizada uma incisão na linha médio-dorsal do crânio, compreendendo desde a região interauricular até a região interorbitária. A fáscia subjacente e o perióstio foram raspados de modo a expor a calota craniana. Com um micromotor de baixa rotação e uma broca esférica nº 5, retirou-se um fragmento circular da calota craniana de aproximadamente 4 mm de diâmetro, tendo como ponto central de referência, o lambda. Esse fragmento foi colocado em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Após a retirada do fragmento da calota craniana, foi possível ver a junção do seio venoso sagital superior e transversal (em forma de Y). Com dois fios catgut 5-0 passados delicadamente por baixo do seio sagital, um próximo à confluência dos seios e outro mais afastado deste ponto, de modo que fossem tracionados, obteve-se a ligadura do seio venoso. Sob lupa estereoscópica, realizou-se uma incisão entre os dois nós e, em seguida, o nó próximo à confluência foi afastado para visibilização e retirada da glândula

pineal por intermédio de pinça de microcirurgia. Em seguida, o fragmento da calota craniana foi recolocado em seu lugar e as camadas cirúrgicas, suturadas.

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 200 µg por 100 g de peso corporal, entre o período das 18:00 às 19:00 horas (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 contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu inoculações diárias de 0,1ml do veículo por via subcutânea (Redins et al. 2000).

A aplicação das células tumorais em todos os grupos experimentais procedeu-se ao 60º dia de experimento. A manutenção das células tumorais foi realizada através de repiques semanais do fluido ascítico *in vivo*, na qual $1,02 \times 10^6$ células tumorais em um volume de 0,2 ml foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos receptores a cada 7 dias. Para a obtenção do tumor na forma sólida, os animais receberam uma injeção subcutânea na região axilar de 0,05 ml da suspensão celular, contendo $2,5 \times 10^6$ células tumorais.

Foram realizadas medidas diárias dos diâmetros do tumor a partir do quinto dia após a inoculação das células tumorais com auxílio de paquímetro. O cálculo do crescimento tumoral foi realizado mediante a 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 em seus três planos perpendiculares (Boursot 2009). O percentual de inibição tumoral foi calculado no 12º dia após a inoculação do tumor, segundo a equação % Inibição Tumoral = $(C - T)/C \times 100\%$ proposta por Sousa et al. (2010), onde C = peso médio dos tumores dos grupos controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados com melatonina.

Para a determinação da sobrevida, os animais dos grupos experimentais foram observados diariamente, após a inoculação do tumor de Ehrlich, durante o período de 12 dias. A partir desse monitoramento foram realizados o registro da mortalidade diária e posteriormente calculada a taxa e a percentagem média de sobrevida (Qureshi 2001).

Ao final do experimento, os animais foram submetidos ao procedimento de eutanásia (Santos et al. 2006) com posterior coleta dos ovários e das massas tumorais, os quais foram fixados e processados pelos procedimentos de rotina para inclusão em resina 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 foi cortado em micrótomo ajustado para $1\mu\text{m}$ e os cortes histológicos foram corados pela técnica da Hematoxilina/Floxina e observados em Microscópio de luz.

Na avaliação histopatológica do tumor levou-se em consideração à observação de atividade mitótica, pontos de necrose, infiltrados inflamatórios, índice apoptótico, 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. Para isto foi utilizado uma ocular de 10X contendo internamente um retículo de Weibel (Weibel 1966) onde contou-se seis campos aleatórios e em sentido horário. Contou-se 100 pontos por campo, totalizando 600 pontos.

A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos ($p > 10\%$). Para os dados com distribuição gaussiana realizou-se uma ANOVA e um teste post-hoc de Tukey ($\alpha = 5\%$). Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn ($\alpha = 5\%$).

RESULTADOS

O resultado do peso dos ovários dos grupos experimentais está sumariado na figura 1. Pode-se observar que a massa dos ovários dos animais dos grupos pinealectomizados (A, C e E) apresentou uma média maior que a massa dos ovários dos animais dos grupos sham-pinealectomizados (B, D e F), sendo os valores no grupo E estatisticamente superior aos grupos A ($p < 0,05$), B ($p < 0,001$), F ($p < 0,01$) e G ($p < 0,05$). Houve também uma redução significativa no peso 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).

A figura 2 apresenta o número de folículos primários, folículos secundários, folículos terciários, folículos atrésicos, 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 ($p < 0,05$).

Se tratando de folículo atrésico, 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 ($p < 0,001$). Quando se observou a frequência de corpo lúteo, o grupo B apresentou maior quantidade quando comparado ao grupo C ($p < 0,01$) e E ($p < 0,05$). 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 ($p < 0,05$).

Na região cortical dos ovários dos animais pinealectomizados, foi possível observar folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento, com predominância de folículos terciários, além de alguns corpos lúteos. Houve uma redução significativa no número de folículos terciários e folículos atrésicos nos grupos sham-pinealectomizados quando comparados aos pinealectomizados, além de grande predominância de corpos lúteos (Fig. 3). O número de corpo lúteo mostrou-se ainda maior no grupo B, no qual os animais além de produzirem melatonina endógena, receberam aplicação exógena.

A massa tumoral de todos os animais mostrou-se desenvolvida a partir de 5 dias após a inoculação. Estas massas apresentavam formato aproximado ao de um elipsoide e tamanhos variados, localizadas na região axilar subcutânea, não sendo observadas diferenças anatomopatológicas entre os tumores dos animais dos grupos experimentais. Ao exame macroscópico a massa tumoral apresentava superfície irregular. Os animais pinealectomizados apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle no que se refere ao crescimento do tumor (fig. 4), podendo se verificar um aumento significativo do grupo E em comparação ao grupo G ($t = 2,33$; $p < 0,05$) e entre o grupo C e o grupo G ($t = 2,69$; $p < 0,05$).

No quadro 2, 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 neste quadro observou-se que os animais pinealectomizados tratados com melatonina apresentaram uma taxa de crescimento tumoral inferior à encontrada para os animais dos grupos C, pinealectomizados sem tratamento e para os animais do grupo E, animais pinealectomizados 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 no quadro 2, 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 coluna das razões 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; provavelmente, devido à um efeito somatório dos níveis de melatonina normais dos respectivos animais do grupo mais a melatonina aplicada como tratamento.

A partir do resultado das percentagens de inibição do crescimento do tumor de Ehrlich devido à ação da melatonina (fig. 5), constatou-se que a dose utilizada alcançou uma inibição de 45,9% no grupo A e 55,7% no grupo B. Os demais grupos não apresentaram inibição tumoral quando comparados ao grupo controle.

A análise histológica dos tumores dos animais dos grupos experimentais revelou a presença de células neoplásicas pleomórficas, com núcleos bastante volumosos, alterando-se a relação núcleo-citoplasma, com intenso grau de hipercromasia e nucléolos proeminentes (fig. 6D). Células gigantes multinucleadas e figuras mitóticas apresentaram-se muito frequentes (fig. 6D). Também se observou 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.

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 grupos pinealectomizados sem tratamento e tratado 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.

A análise de sobrevivência é a técnica ideal para se analisar respostas binárias e aqui foi utilizada para observar a ocorrência de óbito. 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 86% no 7º dia e de 71% do 9º ao 12º dia. No grupo D a sobrevida cumulativa foi de 67% no 12º dia e no grupo E foi de 67% no 10º dia. A sobrevida cumulativa foi de 86% no 11º dia para o grupo F. Apesar dos animais pinealectomizados apresentarem uma redução no tempo de sobrevida quando comparado aos demais grupos, foi observado

através do teste de log-rank, que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A redução no peso dos ovários dos animais dos grupos tratados com melatonina, corroboram com os achados de Prata-Lima et al. (2004), nos quais ratos expostos a luz contínua durante oito meses, ovariectomizados após os primeiros 4 meses e tratados com melatonina durante os quatro meses subsequentes, apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no peso dos ovários. Estudos realizados por Chuffa et al. (2011) também relataram a redução do peso dos ovários em ratos não pinealectomizados que receberam 100 $\mu\text{g}/100$ g de melatonina durante 60 dias consecutivos. Esta ação da melatonina no ovário pode ser justificada pela identificação de sítios de ligação da melatonina (Sirotkin & Schaeffer 1997) e da caracterização do receptor de melatonina em ovários de ratas (Tamura et al. 2009). Estes fatos sugerem que a melatonina tem influência no funcionamento do sistema genital, principalmente nas gônadas (Maganhin et al. 2009b).

O elevado número de corpo lúteo encontrado nos animais sham-pinealectomizados tratados com melatonina, está de acordo com estudos realizados por Smith et al. (1975), em que os autores relataram que a formação do corpo lúteo alcança sua máxima dimensão na fase de diestro, quando há um decréscimo nos níveis de estrógeno. Resultados semelhantes aos achados da frequência de corpo lúteo quando em aumento de melatonina foi encontrado por Santos et al. (2006). Esses resultados confirmam a ação anti-gonadotrófica da melatonina, alterando a secreção dos pulsos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), e por sua vez, a liberação de hormônios gonadotróficos (FSH e LH) e a produção de estrógeno e progesterona no ovário, como relatado por Adashi (1991).

Em alguns ovários dos grupos pinealectomizados observou-se uma extensa área vascularizada, isto se deve a reorganização dos capilares sanguíneos, a fim de suprir as necessidades teciduais durante as fases de crescimento e atresia folicular (Barboni 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).

O tratamento com melatonina de animais não pinealectomizados, na dose de 200mg/100g, parece ter importante efeito sobre o metabolismo das células tumorais, em

especial os mecanismos reguladores da multiplicação celular, fato, de certa forma, também observado por Srinivasan et al. (2008). O fato de animais pinealectomizados tratados com melatonina apresentarem uma taxa de crescimento tumoral inferior a de animais pinealectomizados sem tratamento e tratados com veículo da melatonina, de certa forma significa que a presença da melatonina diluída em etanol afeta realmente os mecanismos associados à multiplicação das células tumorais. Embora seja interessante sugerir que o aumento no crescimento do tumoral dos grupos C e E em relação ao controle, ocorra devido aos estímulos proporcionados pela pinealectomia e pelo emprego do álcool etílico como componente eluente do substrato ativo, potencializando os mecanismos associados ao crescimento do tumor para um valor de $p < 0,05$.

A ação inibitória da melatonina no crescimento do tumor de Ehrlich corrobora com os achados de Srinivasan et al. (2008), nos quais a melatonina mostrou efeito antiproliferativo em culturas de células cancerígenas. No caso do tumor de Ehrlich, assim como é observado em células de câncer de mama humano, a melatonina pode suprimir a proliferação induzida por estrógeno (Hill & Blask, 1988).

A retirada da pineal pode ter consequências sérias sobre os sistemas temporizadores internos do organismo (Menna-Barreto & Wey 2003), afetando as disponibilidades metabólicas dirigidas para as ações de crescimento celular. No caso do álcool etílico, nas concentrações empregadas, bem possivelmente, pode-se ter uma alteração importante na solubilidade de substratos químicos através da membrana plasmática, tornando estes mais acessíveis aos mecanismos citoplasmáticos, neste caso, em especial, potencializando-os (Rang et al. 2007).

Os resultados encontrados a respeito do erro-padrão das médias da taxa de crescimento tumoral podem ter sido em decorrência da grande variação das medidas dos tumores em relação ao tamanho da amostra avaliada (tab. 2). Esta diferença de comportamento do tumor entre os animais deve-se provavelmente à variação na constituição do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), já que os camundongos utilizados não foram isogênicos. Estes dados são corroborados pelos achados de Ashewell et al. (1994), que observaram que o desenvolvimento de tumores em camundongos se apresentam de forma diferente entre animais isogênicos e não isogênicos.

Os dados do crescimento tumoral estão de acordo com os resultados apresentados na morfometria e morfologia do ovário, onde os animais pinealectomizados apresentaram modificações ovarianas devido ao aumento no nível de estrógeno e, por conseguinte

foram os que apresentaram o maior crescimento tumoral. Em contrapartida, a administração de melatonina reduziu o nível de estrógeno e inibiu o crescimento do tumor.

Histologicamente, a observação de áreas de necrose no tumor deve-se 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 a diminuição da melatonina e consequente aumento de estrógeno, cuja função é a indução de mitoses em células iniciadas (Lee et al. 2001). Em contrapartida, o elevado número de apoptose em animais que receberam melatonina, corrobora com estudos realizados por Sainz et al. (2005). Há evidências de que o estrógeno interfira na expressão do gene bcl-2, que controla o processo de apoptose (Suh 2003).

A sobrevida cumulativa observada nos nossos achados corrobora com 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 melhorar o sofrimento do paciente (Vijayalaxmi, 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 propiciando um prolongamento na sobrevida dos pacientes. Em contrapartida, pode-se conjecturar que eventuais alterações nos padrões de ritmicidade endógena para a melatonina, pode predispor os organismos à 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.

Agradecimentos.- Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA)/UFRPE e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e Bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

- Adashi E.Y. 1991. The ovarian life cycle, p.202-204. In: Yen S.S.C. & Jaffe R.B. Reproductive Endocrinology. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Ashewell J.P., Berger N.A., Cidrowski J.A., Lane D.P. & Korsmeyer S.J. 1994. Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunology Today*. 15:147-151.
- Barboni B., Turriani M., Galeati G., Spinaci M., Bacci M.L., Forni M. & Mattioli M. 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biology of Reproduction*. 63:858-864.
- Blask D.E. & Hill, S.M. 1986. Effects of melatonin on cancer: Studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Journal of Neural Transmission*. 21:433-449.
- Belo A.V., Barcelo L.S., Ferreira M.A., Teixeira M.M., Andrade S.P. 2004. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor mice. *Life Science*. 14:2827-2837.
- Boursot C., Le Borgne A., Barillot I., Venel Y., Muret A., Baulieu J.L. & Prunier-Aesch C. 2009. Segmentation automatique du volume tumoral des cancers pulmonaires non à petites cellules sur la 18F-FDG TEP-TDM en vue d'un traitement par radiothérapie. *Médecine Nucléaire*. 33:440-449.
- Cavalcanti M.F. & Cassali G.D. 2006. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Revista Clínica Veterinária*. 61:56-63.
- Cote R.J. & Taylor C.R. 1994. Immunohistochemical detection of steroid hormone receptors. In: *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. 2 ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- 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. 2011. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44:217-223.
- De Nardi A.B., Rodaski S., Sousa R.S., Costa T.A., Macedo T.R., Rodigheri S.M., Rios A. & Piekarcz C.H. 2002. Prevalência de neoplasias e modalidade de tratamentos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*. 7:15-26.
- Ferrara N., Houck K., Jakeman L. & Leung D.W. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Review*. 13:18-32.
- Hill S.M. & Blask D.E. 1988. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research*. 48:6121-6126.

- Lee D.S. et al. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. 2001. Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology. 501:84-86.
- Lissoni P., Barni S., Ardizzoia A., Paolorossi F., Crispino S., Tancini G., Tisi E. & Archili. 1992. Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced nonsmall cell lung cancer resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. *Oncology*. 49:336–339.
- 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. 2009a. Rat pinealectomy: a modified direct visual approach. *Acta Cirurgica Brasileira*. 24:321-324.
- 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. 2009b. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 54:267-271.
- Menna-Barreto I. & Wey D. 2007. Ontogênese do sistema de temporização – a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. *Psicologia USP*. 18:133-153.
- Palermo-Neto J., Massoco C.O. & Souza W.R. 2003. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behavior and Immunity*. 17:43-54.
- Prata-Lima M.F., Baracat E.C. & Simões M.J. 2004. Effects of melatonina on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*. 37:987-995.
- Qureshi S., Al-Shabanah O.A., Al-harbi M.M., Al-Bekairi A.M. & Raza M. 2001. Boric acid enhances *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*, 165:1–11.
- Redins G.M., Redins C.A. & Novaes J.C. 2000. The effect of treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal gland: a quantitative study. *Brazilian Journal Biology*. 61:679-684.
- Rang H.P., Dale M.M. & Ritter J.M. 2007. *Farmacologia*. Editora Elsevier, Rio de Janeiro.
- Sainz R.M., Mayo J.C., Tan D.X., Leon J., Manchester L. & Reiter R.J. 2005. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate*. 63:29–43.
- Santos K.R.P., Teixeira A.A.C., Teixeira V.W. & Silva Neto E. J. 2006. Análise Histológica do Ovário de Ratas Submetidas à Ausência de Luz. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 10:269-276.
- Sirotkin A.V. & Schaeffer H.J. 1997. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *Journal of Endocrinology*. 154:1-5.
- Smith M.S., Freeman M.E. & Neill J.D. 1975. 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*. 96:219-226.
- 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. 2010. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 46:199-203.

Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-perumal S.R., Trakht I., Esquifino A.I., Cardinali D.P. & Maestroni G.J. 2008. Melatonin, environmental light, and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 108:339-350.

Suh K.S. 2003. Soybean inhibit tumor necrosis factor α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry*. 63:209-215.

Tamura H., Nakamura Y., Korkmaz A., Manchester L.C., Tan D.X., Sugino N. & Russel J.R. 2009. Melatonin and the ovary: Physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility*. 92:328–343.

Vijayalaxmi T.C.R., Reiter R.J. & Herman T.S. 2002. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *Journal of Clinical Oncology*. 20:575–601.

Weibel E.R., Kistler G.S. & Scherle W.F. 1966. Practical stereological method for morphometrics cytology. *Journal of Cell Biology*. 30:23-38.

Legendas das Figuras

- Figura 1. Peso médio e desvio-padrão dos ovários dos animais nos grupos experimentais. * Diferença significativa. A- Pinealectomizado e tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado e tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.
- Figura 2. Número de folículos primários, secundários, terciários e atrésicos, corpo lúteo e vasos sanguíneos nos ovários dos animais nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado e tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado e tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina.
- Figura 3. Fotomicrografia de ovário de camundongos fêmeas nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado e tratado com melatonina. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas) e presença de vasos sanguíneos (V). B- Sham-pinealectomizado e tratado com melatonina. Diversos corpos lúteos (*) e folículos (setas). C- Pinealectomizado sem tratamento. Presença de folículos atrésicos (seta longa). D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. Presença de corpos lúteos (*) e folículos (setas). E- Pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. Região medular bastante desenvolvida com presença de inúmeros vasos sanguíneos (V). F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. Presença de corpo lúteo (*) e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas). Hematoxilina-Floxina: 100X.
- Figura 4. Evolução do crescimento tumoral do 5º ao 12º dia após o implante do tumor. A- Pinealectomizado e tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado e tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.
- Figura 5. Inibição do crescimento do tumor de Ehrlich. A- Pinealectomizado e tratado com melatonina. B- Sham-pinealectomizado e tratado com melatonina. C- Pinealectomizado sem tratamento. D- Sham-pinealectomizado sem tratamento. E- Pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina.
- 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.
- 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 e tratado com o veículo da melatonina. F- Sham-pinealectomizado e tratado com o veículo da melatonina. G- Controle.

Os Quadros

Quadro 1. Tratamento dos grupos experimentais

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

Quadro 2. Taxa de variação infinitesimal do volume do tumor em função do tempo.

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

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

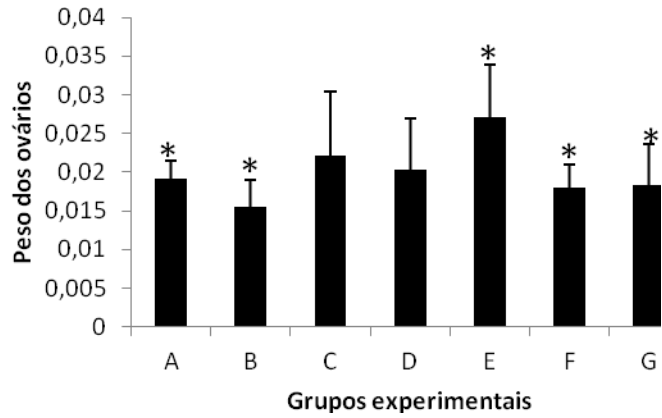


Figura 1

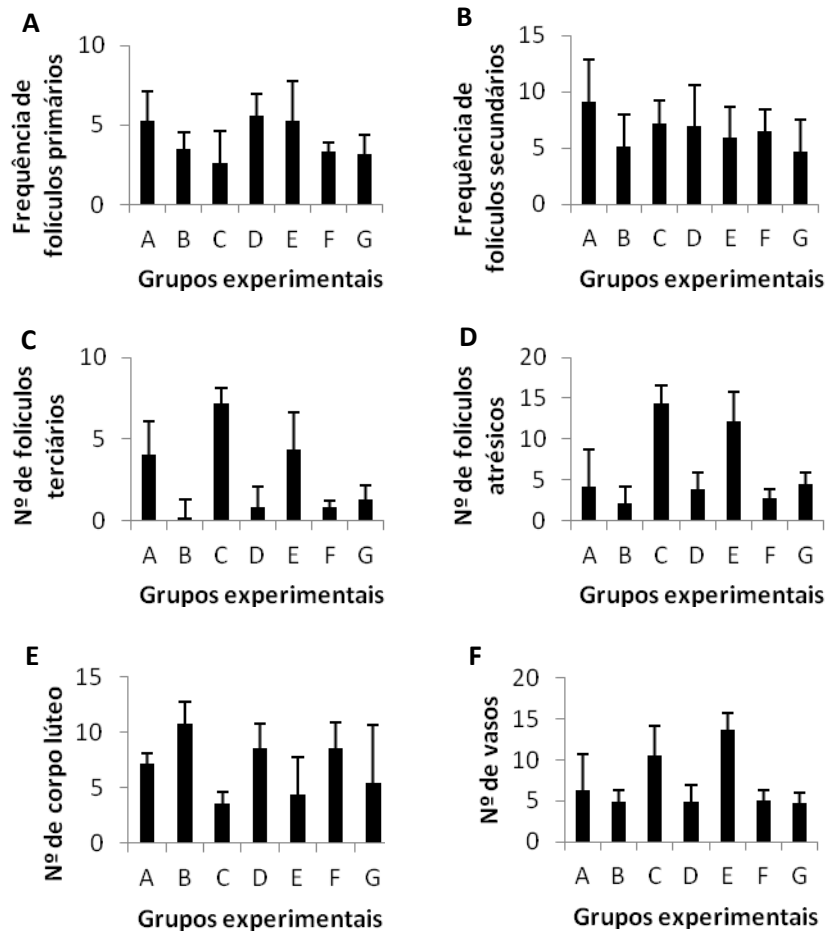


Figura 2

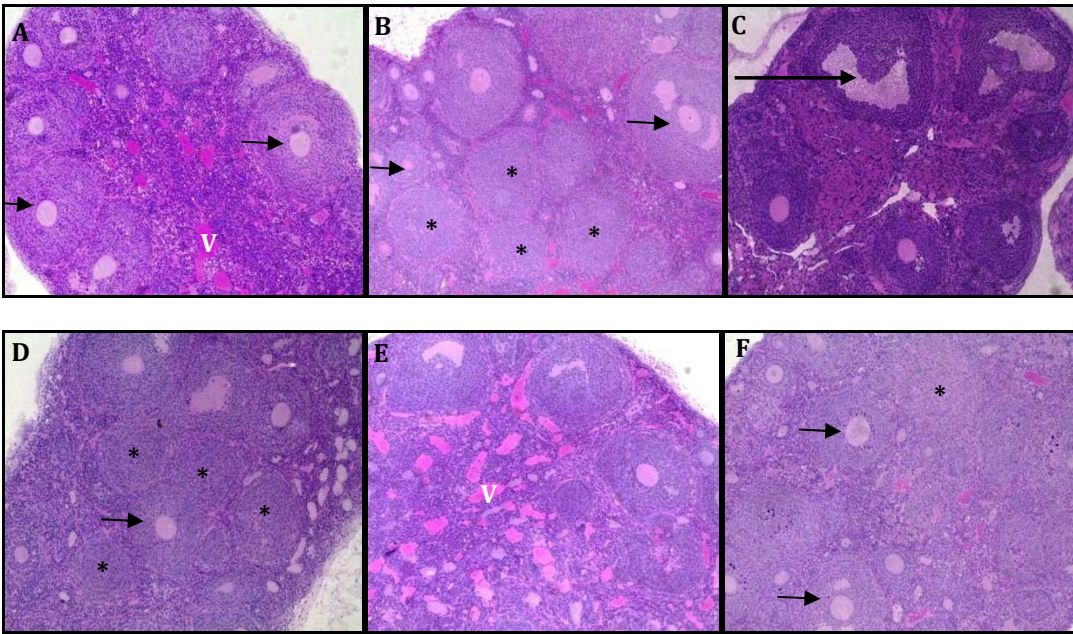


Figura 3

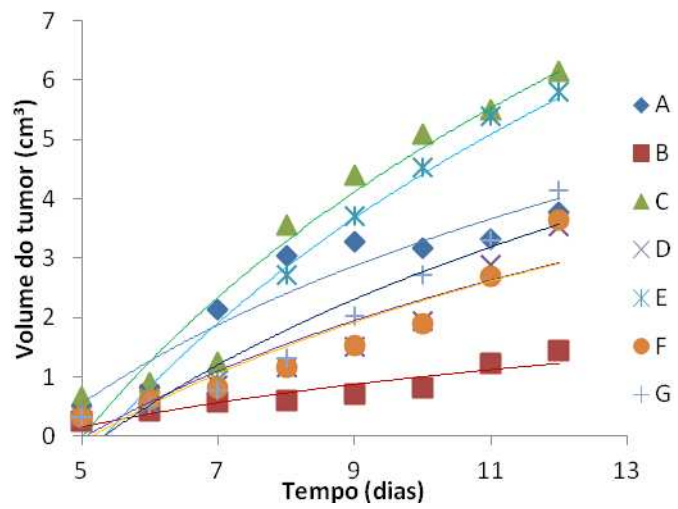


Figura 4

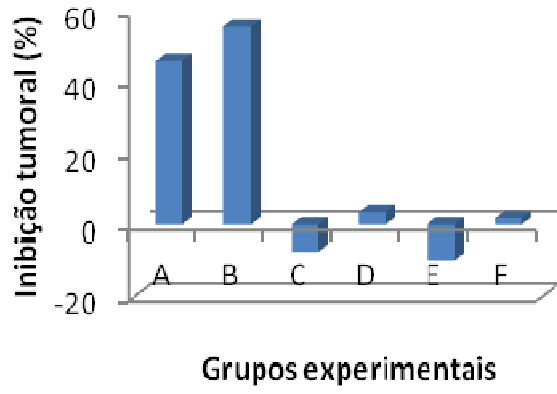


Figura 5

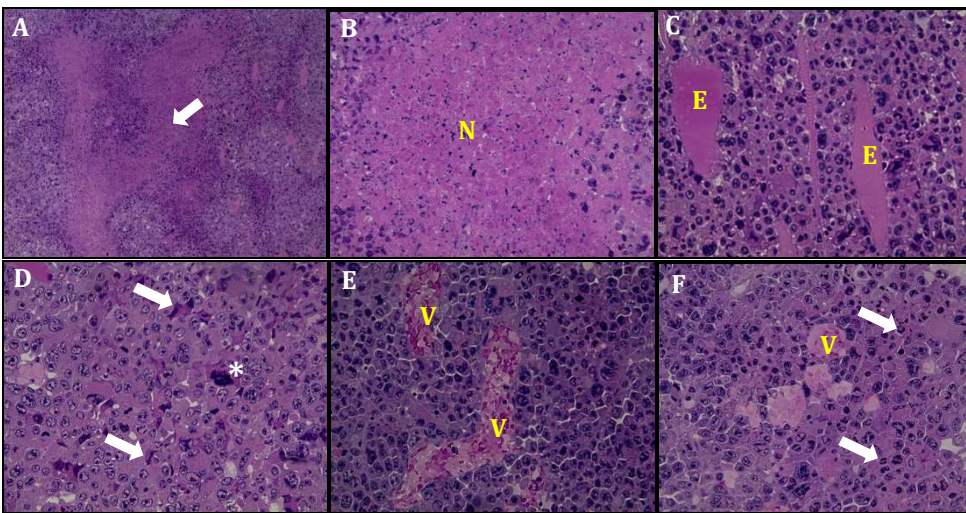


Figura 6

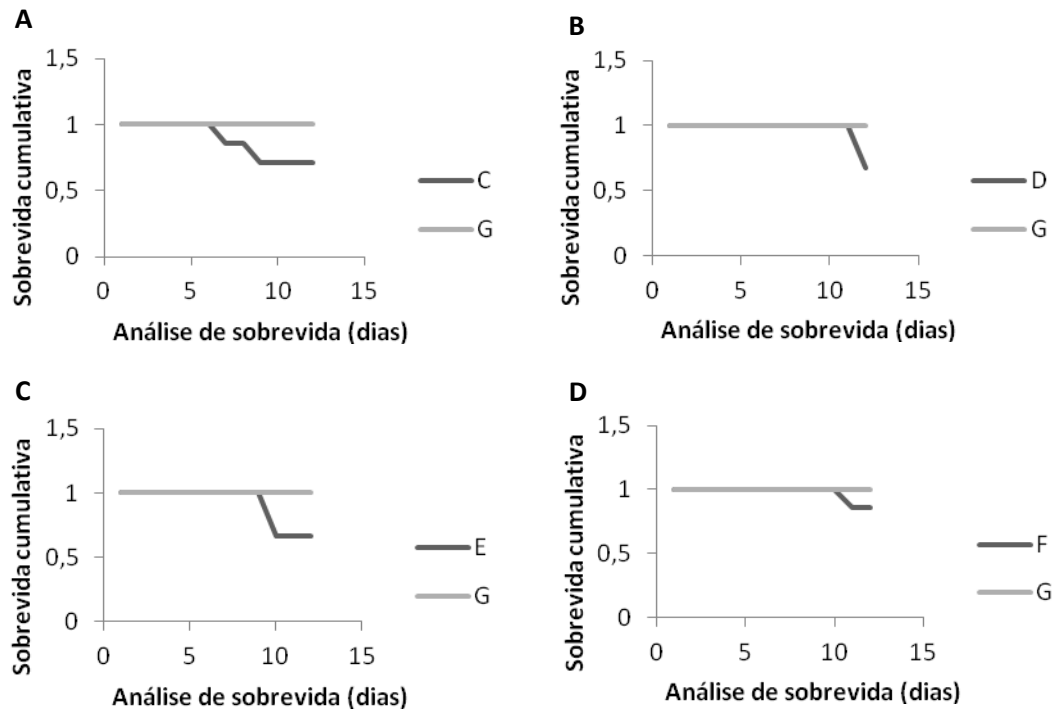


Figura 7

Ação da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento tumoral e sobrevida de Camundongos Swiss implantados com tumor de Ehrlich

DANIELLE DUTRA PEREIRA & JOAQUIM EVÊNCIO-NETO*

*Autor para correspondência: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: 81-3320-6057. E-mail: evencio@dmfa.ufrpe.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento tumoral e sobrevida de Camundongos Swiss fêmeas implantadas com tumor de Ehrlich, através de interações com o aparelho reprodutor. Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), de 60 dias de idade, divididas em sete grupos experimentais (n = 8 animais/grupo): A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina; B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina; C- Pinealectomizado tratado com estrógeno; D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno; E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno; F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno; G- Controle. Alterações ovarianas foram significativas entre os grupos. O estrógeno exógeno contribuiu para o aumento do número de folículos nos animais pinealectomizados e sham-pinealectomizados, enquanto que a melatonina aumentou a frequência de corpo lúteo. Os animais pinealectomizados tratados com estrógeno apresentaram maior taxa de crescimento tumoral e os animais sham-pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina exibiram uma maior percentagem de inibição tumoral. A sobrevida foi menor no grupo pinealectomizado tratado com estrógeno. A análise destes resultados nos permite concluir que o estrógeno e a melatonina, através de sua atuação no ovário, interferem nos mecanismos regulatórios dos processos de crescimento do tumor de Ehrlich. Eventuais alterações nos padrões de ritmicidade para a melatonina assim como para o estrógeno, pode predispor os organismos à uma maior incidência de tumor.

Palavras-chave: estrógeno, melatonina, pinealectomia, sobrevida, tumor

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antitumor activity of melatonin and estrogen on tumor growth and survival of female Swiss mice implanted with Ehrlich tumor, through its interaction with the reproductive system. We used 56 female Swiss mice (*Mus musculus*), 60 days of age, were divided into seven groups (n = 8 animals/group): A- Pinealectomized estrogen and melatonin treated; B- Sham-Pinealectomized estrogen and melatonin treated; C- Pinealectomized estrogen treated; D- Sham-Pinealectomized estrogen treated; E- Pinealectomized estrogen vehicle treated; F- Sham-Pinealectomized estrogen vehicle treated; G- Control. Ovarian changes were observed between the groups. The exogenous estrogens has contributed to the increased number of follicles in pinealectomized animals and sham-pinealectomized, whereas melatonin increased frequency of corpus luteum. The pinealectomized estrogen treated animals had a higher rate of tumor growth and sham-Pinealectomized estrogen and melatonin treated animals exhibited a higher percentage of tumor inhibition. Survival was lower in pinealectomized estrogen treated group. Analysis of these results allows us to conclude that estrogen and melatonin, through its actions in the ovary interfere with regulatory mechanisms of the processes of Ehrlich tumor growth. Possible changes in the patterns of rhythmicity for melatonin and to estrogen, may predispose organisms to a higher incidence of tumor.

Keywords: estrogen, melatonin, pinealectomy, survival, tumor

INTRODUÇÃO

O tumor mamário canino tem despertado grande interesse dos pesquisadores devido a sua elevada incidência (CAVALCANTI e CASSALI, 2006) e grande diversidade morfológica (PELETEIRO, 1994). A etiologia deste tipo de tumor é multifatorial, com a participação de fatores genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Os hormônios são responsáveis por grande parte do controle no metabolismo das células. O descontrole hormonal acarreta a proliferação celular com consequentes mutações genéticas, levando a várias alterações, dentre elas o câncer (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

A forma como os fatores hormonais atuam estimulando ou inibindo o processo de crescimento tumoral tem sido estudada, buscando-se compreender a interação entre diferentes hormônios e suas implicações para o metabolismo celular. Dentre os hormônios que interferem na dinâmica do crescimento tumoral estão o estrógeno (SUH *et al.*, 2003) e a melatonina (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, têm-se empregado o tratamento hormonal como método de prevenção ou interrupção gestacional, visando o controle populacional de cães. Os contraceptivos à base de estrógenos, como o Dietilestilbestrol, o Cipionato de Estradiol, o Benzoato ou Valerato de Estradiol, são os mais utilizados (OLIVEIRA, 2007). Zuccari *et al.* (2001), mostraram que a utilização de terapia hormonal com fins contraceptivos, ou em casos de pseudociese, provocam predisposição ao aparecimento de neoplasia mamária. A proliferação celular desse tipo de tumor é significativamente exacerbada pelo estrógeno (RAZANDI; PEDRAM; LEVIN, 2000).

A melatonina, ao contrário do estrógeno, inibe o crescimento e proliferação de células cancerígenas, além de reduzir a incidência de metástase (SRINIVASAN *et al.*, 2008) e a gênese tumoral, limitando o evento inicial, ou seja, danos no DNA, que precede a mutação necessária para o desenvolvimento do tumor (LUNENFELD, 2006). Em células de câncer de mama humano, a melatonina pode suprimir a proliferação induzida por estrogênio (HILL e BLASK, 1988), através da inibição da atividade transcricional dos receptores de estrógeno α (ER α), enquanto induz a expressão de vias inibitórias de crescimento (RAM *et al.*, 1998). Um mecanismo proposto para a ação oncostática da melatonina no câncer de mama é a inibição do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), dificultando assim a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) e, por consequência, reduzindo a produção ovariana de estradiol. Dessa forma se reduz a resposta mitogênica do câncer ao estradiol, o que pode explicar os efeitos protetores do hormônio neste tipo de câncer (BLASK e HILL, 1986).

Em virtude de similaridades biológicas com as neoplasias caninas, tumores experimentais transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, têm despertado o interesse de pesquisadores para empregá-los como modelo comparativo para o estudo desta patologia. A vantagem de estudar o carcinoma de Ehrlich está no conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas, além do desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de

estudo (PALERMO-NETO *et al.*, 2003). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento tumoral e sobrevida de Camundongos Swiss implantados com tumor de Ehrlich.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com o número 016921/2012.

Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), de 60 dias de idade, 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 contínuo de 12h/dia, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas, utilizando lâmpada fluorescente, luz do dia, de 40 W. A temperatura da sala foi ajustada para 22 ± 2 °C.

Os camundongos foram distribuídos em delineamento em blocos inteiramente casualizados (DBC), sete tratamentos e oito animais por unidade experimental (Tab. 1).

Tabela 1. Tratamento dos grupos experimentais.

Tratamento	Pinealectomizados	Sham-pinealectomizados
Estrógeno e Melatonina	A	B
Estrógeno	C	D
Veículo do Estrógeno	E	F
Controle		G

A pinealectomia foi realizada segundo o método preconizado por Maganhin *et al.* (2009), na qual os animais foram inicialmente anestesiados com cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg), via intramuscular. Sob efeito do anestésico, realizou-se a tricotomia da região dorsal do crânio. Em seguida, foi realizada uma incisão na linha médio-dorsal do crânio, compreendendo desde a região interauricular até a região interorbitária. A fáscia subjacente e o perióstio foram raspados de modo a expor a calota craniana. Com um micromotor de baixa

rotação e uma broca esférica nº 5, retirou-se um fragmento circular da calota craniana de aproximadamente 4 mm de diâmetro, tendo como ponto central de referência o lambda. Esse fragmento foi colocado em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Após a retirada do fragmento da calota craniana, foi possível ver a junção do seio venoso sagital superior e transversal (em forma de Y). Com dois fios catgut 5-0 passados por baixo do seio sagital, um próximo à confluência dos seios e outro mais afastado deste ponto, de modo que fossem tracionados, obteve-se a ligadura do seio venoso. Sob lupa estereoscópica, realizou-se uma incisão entre os dois nós e, em seguida, o nó próximo à confluência foi afastado para visibilização e retirada da glândula pineal por intermédio de pinça de microcirurgia (Roca Inox®). Em seguida, o fragmento da calota craniana foi recolocado em seu lugar e as camadas cirúrgicas foram suturadas.

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 200 µg por 100 g de peso corporal, entre o período das 18:00 às 19:00 horas (PRATA-LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004), por via subcutânea. A melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis, Mo., USA) foi dissolvida em 0,1ml de NaCl contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu inoculações diárias de 0,1ml do veículo por via subcutânea (REDINS; REDINS; NOVAES, 2000).

O benzoato de estradiol foi administrado durante o mesmo tempo que a melatonina, por via subcutânea, na dose de 20 µg/kg, entre o período das 15:00 às 16:00. A solução de benzoato de estradiol foi preparada dissolvendo-se o produto em óleo de amendoim estéril, que é o veículo original do produto, de tal forma que a dosagem está contida em 0,1ml da solução (VICELLI; GURGEL; ALVARENGA, 2006).

A aplicação das células tumorais nos grupos experimentais procedeu-se ao 60º dia de experimento. A manutenção das células tumorais foi realizada através de

repiques semanais do fluido ascítico *in vivo*, na qual $1,02 \times 10^6$ células tumorais em um volume de 0,2 ml foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos receptores a cada 7 dias. Para a obtenção do tumor na forma sólida, os animais receberam uma injeção subcutânea na região axilar de 0,05 ml da suspensão celular, contendo $2,5 \times 10^6$ células tumorais.

Foram realizadas medidas diárias dos diâmetros do tumor a partir do quinto dia após a inoculação das células tumorais com auxílio de paquímetro. O cálculo do crescimento tumoral foi realizado mediante a 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 em seus três planos perpendiculares (BOURSOT *et al.*, 2009). O percentual de inibição tumoral foi calculado no 12º dia após a inoculação do tumor, segundo a equação $\% \text{ Inibição Tumoral} = (C - T)/C \times 100\%$ proposta por Sousa *et al.* (2010), onde C = peso médio dos tumores dos grupos controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados com melatonina.

Para a determinação da sobrevivência, os animais dos grupos experimentais foram observados diariamente, após a inoculação do tumor de Ehrlich, durante o período de 12 dias. A partir desse monitoramento, foi realizado o registro da mortalidade diária e posteriormente calculada a taxa e a percentagem média de sobrevivência (QURESHI *et al.*, 2001).

Ao final do experimento, os animais foram submetidos ao procedimento de eutanásia (SANTOS *et al.*, 2006) com posterior coleta dos ovários e das massas tumorais, os quais foram fixados e processados pelos procedimentos de rotina para inclusão em resina 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 foi cortado em micrótomo ajustado para $1\mu\text{m}$ e os cortes histológicos foram corados pela técnica da Hematoxilina/Floxina e observados em Microscópio de luz.

Na avaliação histopatológica do tumor levou-se em consideração à observação de atividade mitótica, pontos de necrose, infiltrados inflamatórios, índice apoptótico, 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. Para isto foi utilizado uma ocular de 10X contendo internamente um retículo de WEIBEL (WEIBEL; KISTLER;

SCHERLE, 1966) onde contou-se seis campos aleatórios e em sentido horário. Contou-se 100 pontos por campo, totalizando 600 pontos.

A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos ($p > 10\%$). Para os dados com distribuição gaussiana realizou-se uma ANOVA e um teste post-hoc de Tukey ($\alpha = 5\%$). Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn ($\alpha = 5\%$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peso dos ovários

O peso dos ovários dos animais dos grupos pinealectomizados e sham-pinealectomizados tratados com estrógeno apresentou diferença estatística significativa, sendo a média do grupo C superior a do grupo B ($p < 0,01$) e a do grupo F ($p < 0,01$). O grupo D apresentou média maior que a do grupo F ($p < 0,05$) (fig. 1).

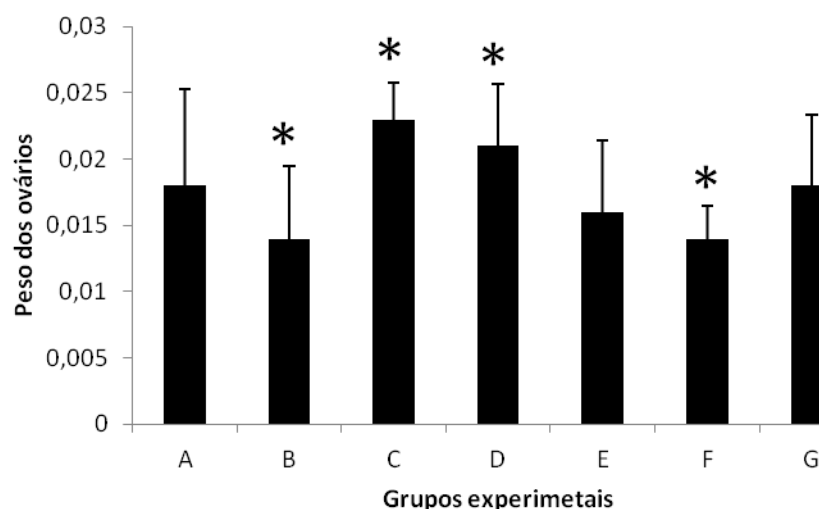


Figura 1. Peso médio e desvio-padrão dos ovários dos animais nos grupos experimentais. * Diferença significativa. A-Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle.

Nossos achados estão de acordo com estudos experimentais realizados em ratas e em hamster, nos quais a retirada da pineal e consequente redução nos níveis de melatonina e aumento de estrógeno, resulta em hipertrofia ovariana (DAIR

et al., 2007). Em contraste, estudos realizados por Chuffa *et al.* (2011), revelaram que a administração exógena de 100µ/100g de melatonina reduz o peso dos ovários e retarda o amadurecimento sexual em ratas, como observado em nossos experimentos. Estudos ainda relatam que órgãos reprodutivos de hamsters sírios mantidos naturalmente sob dias curtos e temperaturas reduzidas, normalmente experimentam regressão gonadal no inverno, a não ser que a glândula pineal seja cirurgicamente removida (REITER, 1973).

Análise morfométrica e morfológica dos ovários

Na análise morfométrica dos ovários, pôde-se observar que o grupo A apresentou uma maior frequência de folículos primários quando comparado ao grupo B ($p < 0,05$) (fig. 2A). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto ao número de folículos secundários (fig. 2B). Já quanto o número de folículos terciários (fig. 2C), o grupo C apresentou uma maior frequência de quando comparado ao grupo A ($p < 0,05$), B ($p < 0,05$) e F ($p < 0,05$). Quando se observou o número de folículos atrésicos (fig. 2D), o grupo A apresentou uma menor frequência que o grupo C ($p < 0,01$) e D ($p < 0,05$), e o grupo B também apresentou menor frequência quando comparado aos grupos C ($p < 0,01$) e D ($p < 0,05$). Quando o parâmetro avaliado foi presença de corpo lúteo (fig. 2E), o grupo C exibiu uma menor frequência quando comparado ao grupo A ($p < 0,01$), B ($p < 0,001$) e D ($p < 0,05$), e o grupo B apresentou uma maior quantidade que os grupos E ($p < 0,001$), F ($p < 0,01$) e G ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa com relação à frequência de vasos sanguíneos dos grupos experimentais (fig. 2F).

Os resultados mostraram folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento na região cortical dos ovários das fêmeas pinealectomizadas tratadas com estrógeno e com veículo do estrógeno. Os grupos sham-pinealectomizados tratados com estrógeno e com o veículo do estrógeno, além da presença de folículos em diversos estágios de desenvolvimento, apresentaram também grande frequência de corpos lúteos. A região medular dos ovários das fêmeas dos grupos experimentais mostrou-se constituída por tecido conjuntivo, ricamente vascularizado e numerosas células intersticiais.

Nas fêmeas do grupo sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina, na região cortical, observou-se a predominância de grande quantidade

de corpos lúteos e alguns folículos ovarianos em fase inicial de desenvolvimento. Foi observada uma redução de folículos terciários quando comparado ao grupo sham-pinealectomizado tratado apenas com estrógeno. Esse fato pode estar associado a presença de melatonina, o que pode ter contribuído para a manutenção desses corpos lúteos (SANTOS *et al.*, 2006). Estudos realizados por Baracat *et al.* (2000), mostraram que ratas pinealectomizadas ou submetidas à iluminação contínua apresentam ausência de corpos lúteos. Enquanto os animais tratados com melatonina exibem características contrárias, semelhantes às observadas no presente estudo (fig. 3).

A maturação dos folículos ovarianos depende da liberação de hormônios gonadotróficos (FSH e LH) produzidos pela adeno-hipófise (PAPKOFF; GOSPODAROWICZ; LI, 1967). Entretanto, a melatonina pode alterar a fisiologia e histologia ovariana em roedores (ALEANDRI; SPINA; MORINI, 1996), desempenhando nos mamíferos, um papel de substância antigonadotrófica estando envolvida na regulação das funções reprodutivas (REITER, 1991).

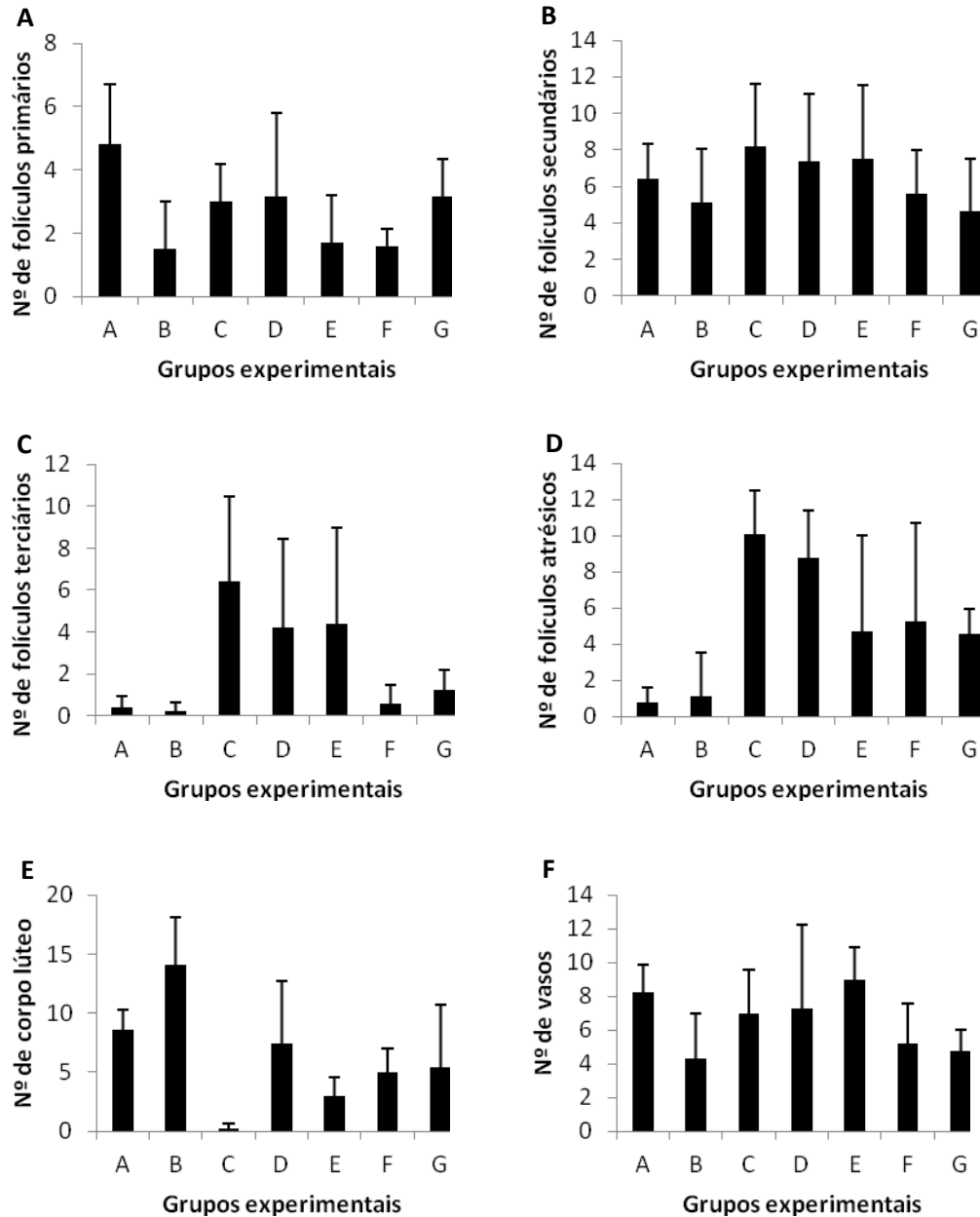


Figura 2. Número de folículos primários, secundários, terciários e atrésicos, corpo lúteo e vasos sanguíneos nos ovários dos animais nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle.

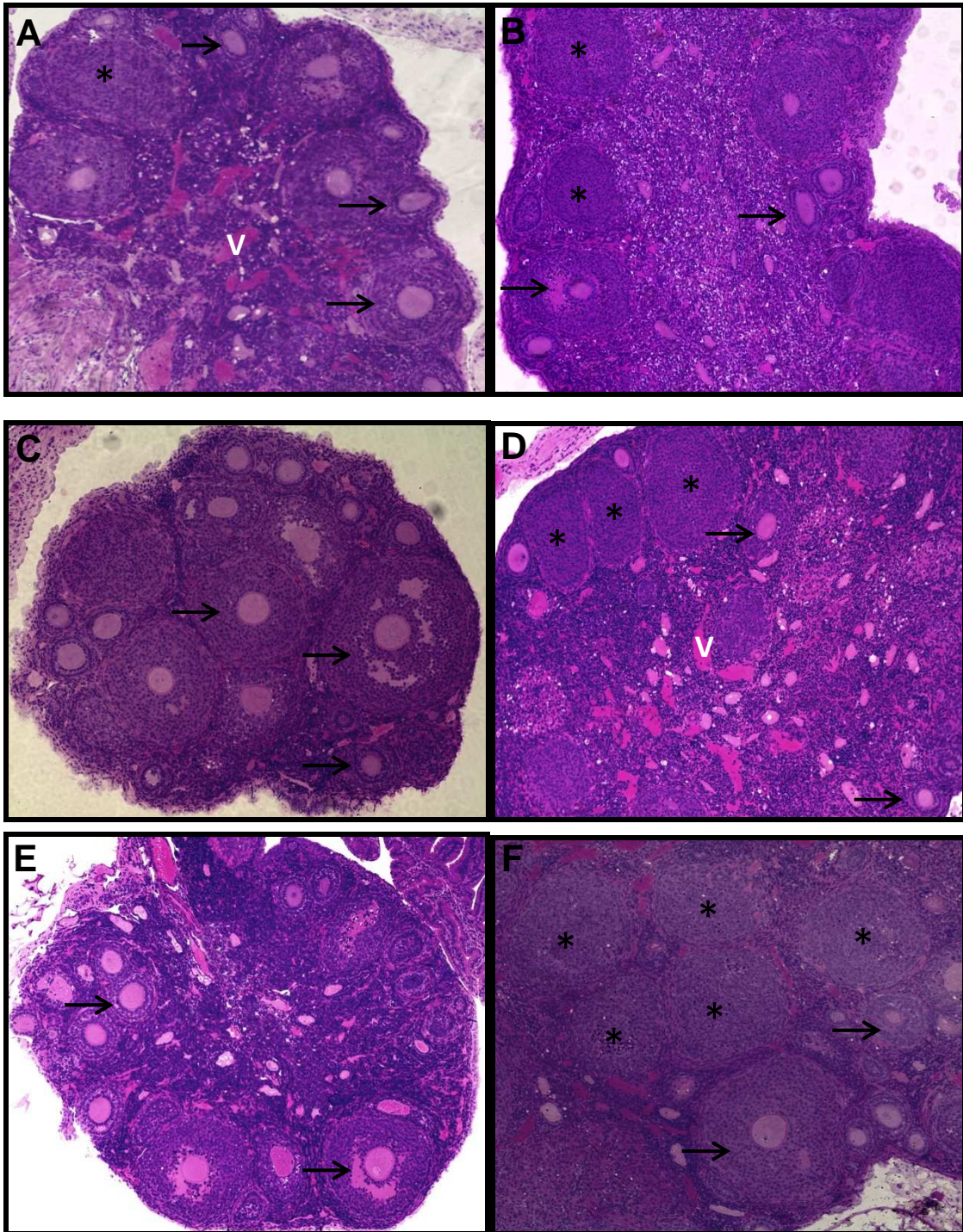


Figura 3. Fotomicrografia de ovário de camundongos fêmeas nos grupos experimentais: A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. Folículos primários e secundários desenvolvimento (setas), vasos sanguíneos (V) e corpo lúteo (*). B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. Presença corpos lúteos (*) e folículos (setas). C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas). D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. Presença de corpos lúteos (*), folículos (setas) e vasos sanguíneos (V). E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. Folículos em diversos estágios de desenvolvimento (setas). F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. Presença de corpos lúteos (*) e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas). Coloração: Hematoxilina-Floxina: Aumento: 100X.

Crescimento tumoral

O crescimento das células *in vivo* no tecido subcutâneo dos camundongos resultou na formação da massa tumoral sólida local em todos os animais inoculados, que apresentaram edema considerável na região axilar aos cinco dias pós-inoculação, tornando-se mais intenso após o décimo dia, sendo observado em alguns, ulceração da pele. A massa tumoral possuía tamanho irregular e superfície lisa.

Na avaliação do crescimento tumoral nos grupos experimentais (fig.4), observou-se que em relação ao grupo controle, houve diferença entre este e o grupo A ($t=2,45$), C ($t=5,51$), D ($t=2,13$) e E ($t=2,47$).

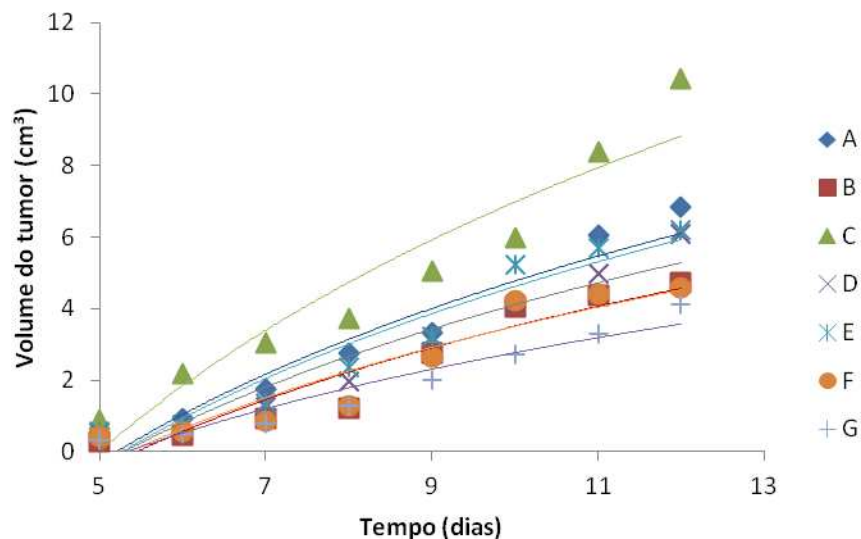


Figura 4. Evolução do crescimento tumoral do 5º ao 12º após o implante do tumor. A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle.

De acordo com a figura 4, pode-se observar que houve um aumento nas dimensões do tumor do grupo A, C, D e E em relação às dimensões do tumor do grupo controle (G). Os grupos B e F não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo G.

Na tabela 2, observou-se que no 5º dia pós-transplante os animais do grupo C apresentaram a maior taxa de crescimento tumoral em relação aos demais grupos, fato também observado para os animais do mesmo grupo no 12º dia; ou seja, o tratamento com benzoato de estradiol em animais pinealectomizados, na dose de 20mg/Kg, parece ter importante efeito sobre a proliferação celular no tumor de Ehrlich de camundongos fêmeas. É interessante assinalar que interferências do estrógeno sobre o tecido epitelial mamário em camundongos já haviam sido descritas por Russo e Russo (2006).

Tabela 2. Taxa de variação infinitesimal do volume do tumor em função do tempo.

Grupo	5º dia	12º dia	Razão entre as taxas
A	1,66 ± 0,33	6,10 ± 0,34	4,4 ± 1,85g
B	1,31 ± 0,32	4,56 ± 1,08	3,25 ± 1,76
C	2,29 ± 0,31	8,82 ± 1,71	6,53 ± 2,82g
D	1,47 ± 0,25	5,28 ± 0,93	3,81 ± 1,25g
E	1,64 ± 0,30	5,93 ± 1,24	4,29 ± 1,95g
F	1,28 ± 0,39	4,53 ± 1,32	3,25 ± 2,23
G	1,00 ± 0,00	3,57 ± 0,88	2,57 ± 1,30

A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle.

Também é importante destacar que todas as taxas infinitesimais de crescimento tumoral aumentaram de forma significativa do 5º para o 12º, para um valor de $p < 0,05$; merecendo destaque os grupos em que os animais recebiam o estradiol como tratamento. Isto de certa forma também pode significar que os efeitos do estrógeno parecem ser mais pronunciados nesta etapa de desenvolvimento tumoral.

Ainda na tabela 2, observou-se que os animais pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina apresentaram uma taxa de crescimento tumoral no 12º dia inferior à encontrada para os animais do grupo C, pinealectomizados tratados com estrógeno, para um valor de $p < 0,05$. Isto, de certa maneira significa que a presença da melatonina afetou os mecanismos associados à multiplicação das células tumorais, mesmo na presença do estradiol.

É interessante assinalar que todos os animais dos grupos pinealectomizados (A, C e E) apresentaram uma taxa de crescimento tumoral, tanto ao 5º como ao 12º dia, significativas em relação às taxas obtidas para os animais do grupo controle, sugerindo que os estímulos proporcionados pela pinealectomia e pelo estrógeno potencializam os mecanismos associados ao crescimento do tumor para um valor de $p < 0,05$.

Estes dados acima ficam melhor explicitados quando se observa a coluna das razões entre as taxas do 5º e 12º na tabela 2. Pode-se assim visualizar que a razão entre as taxas obtidas para os animais do grupo C, animais pinealectomizados tratados com estrógeno, apresentou um maior valor em relação aos demais grupos.

Em linhas gerais pode-se dizer que a desorganização nos mecanismos de temporização endógenos resultante da retirada da pineal, parece diminuir a competência do organismo em controlar melhor os sinais bioquímicos trocados entre os diferentes tecidos (MENNA-BARRETO e WEY, 2007), criando padrões de sinalização temporal que venham a favorecer o desenvolvimento do próprio tumor. De certa forma pode-se também dizer que eventuais alterações nos padrões rítmicos de expressão de hormônios como estrógeno e da própria melatonina em animais sadios podem favorecer ao surgimento de tumores; ou seja a probabilidade de incorporação de tumores nesta fase seria maior.

De certa forma, há diversas evidências segundo as quais um organismo sincronizado reage melhor a condições adversas, como nos processos infecciosos (KATZ; MARPEGAN; BEKINSCHTEIN, 2002). Respostas descontroladas aos padrões de variação dos ritmos biológicos parecem estar associadas ao surgimento de patologias diversas (MENNA-BARRETO e WEY, 2007).

É importante assinalar que os grupos sham-pinealectomizado tratado com veículo do estrógeno (F) e sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina (B) apresentaram taxas de crescimento tumoral semelhantes, no 5º e 12º dia, mas inferiores as taxas obtidas para os animais do grupo pinealectomizado tratado com estrógeno.

Frente a tudo o que foi assinalado acima, pode-se admitir que intervenções cujo objetivo seja a recomposição da organização temporal externa e interna num organismo, devam fazer parte do arsenal de estratégias terapêuticas. Quando isto for uma realidade na prática médica talvez se consiga minimizar os agravos

decorrentes dos protocolos terapêuticos empregados, obtendo-se como consequência um resultado mais eficaz no controle ou mesmo minimização das patologias, acima de tudo, garantindo ao paciente melhor qualidade de vida, durante e após a incursão terapêutica.

A ação do estrógeno e da melatonina sobre as células do tumor de Ehrlich está representada na figura 5, onde se observa a porcentagem de inibição do crescimento tumoral pela ação dos hormônios.

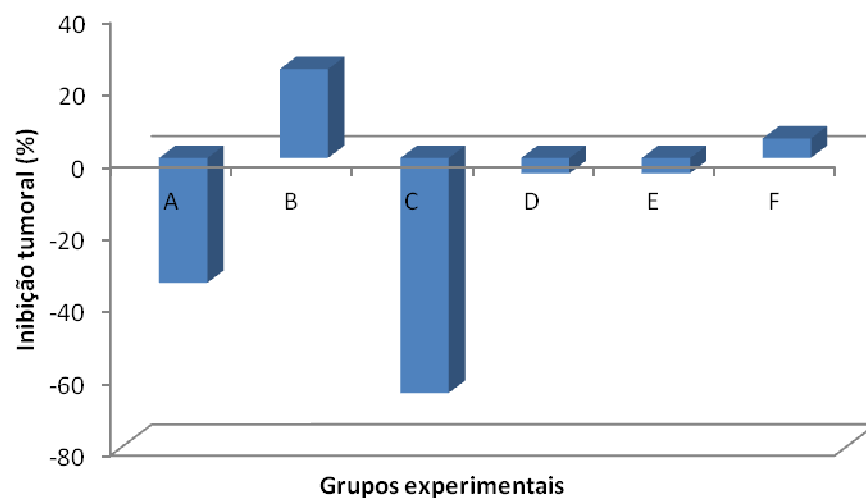


Figura 5. Inibição do crescimento do tumor de Ehrlich. A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno.

A partir do resultado das porcentagens de inibição do crescimento do tumor de Ehrlich devido à ação do estrógeno e da melatonina, constatou-se que as doses de estrógeno e estrógeno associado à melatonina em camundongos pinealectomizados promoveu o crescimento do tumor em 65,22% no grupo C e de 34,67% no grupo A, respectivamente. O grupo B apresentou massa tumoral inferior ao grupo controle (G), resultando em uma inibição de 38,47% do tumor. O grupo D e E não apresentou inibição ou crescimento tumoral.

De fato, nossos resultados corroboram com estudos de biópsias de mamas de mulheres na pós-menopausa, que demonstraram haver maior proliferação no epitélio em usuárias da terapia hormonal, quando comparadas a um grupo de não usuárias de hormônios (VALADARES *et al.*, 2008). Estudos experimentais também

comprovaram alterações proliferativas nas mamas de camundongos fêmeas tratadas com 17-betaestradiol (RUSSO e RUSSO, 2006). O estradiol apresenta efeito proliferativo no parênquima mamário (TORRES *et al.*, 2011). Sob a ação dos hormônios esteroides, o tecido mamário atinge seu desenvolvimento máximo (NAIR *et al.*, 2010). A ação dos hormônios nos órgãos-alvo é decorrente da sua ligação com os receptores intracelulares, modulando a expressão dos genes e, conseqüentemente, a síntese de proteínas específicas (SCHMIDT *et al.*, 2000).

Em contrapartida, a melatonina mostrou ação contrária ao estrógeno, inibindo o crescimento do tumor. Semelhantes aos nossos achados são os estudos realizados por Martinez-Campa *et al.* (2005), em que a melatonina preveniu a promoção e o crescimento de tumores mamários induzidos espontânea ou quimicamente em roedores. Sabe-se ainda, que mulheres com atividade proliferativa neoplásica têm níveis de melatonina muito abaixo do normal (LUBOSHITZKY; HERER; SHEN-ORR, 2004). O provável mecanismo de ação da melatonina seria sua interação com os receptores de estrógeno nas células epiteliais e também por sua capacidade de aumentar a imunidade local, além de apresentar propriedade antioxidante e efeito inibitório na atividade da telomerase, enzima importante na mitose e na proliferação. A melatonina também pode exercer seus efeitos protetores contra o crescimento neoplásico pela inibição da atividade da enzima aromatase (que converte androgênios em estrogênios) (COS *et al.*, 2006).

Análise histológica do Tumor de Ehrlich

Microscopicamente a neoplasia apresentou células intensamente pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada, núcleo com cromatina condensada e nucléolos proeminentes. As inúmeras alterações morfológicas observadas, que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação dos corpos apoptóticos, com preservação da membrana plasmática e conseqüentemente conservação do conteúdo citoplasmático caracterizam o processo apoptótico (EDINGER e THOMPSON, 2004).

Observaram-se extensas áreas de necrose localizadas na região central da massa tumoral (fig. 6A) e a presença de células grandes, algumas das quais eram gigantes e multinucleadas (fig. 6F), além de numerosas figuras mitóticas (fig. 6E), algumas atípicas. Nos grupos pinealectomizados tratado com estrógeno e

pinealectomizados tratado com estrógeno e melatonina, que apresentaram um maior crescimento, a extensão do tecido neoplásico viável era menor em comparação às áreas de necrose, ao contrário dos grupos sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina e sham-pinealectomizado sem tratamento com estrógeno, que apresentaram menor crescimento e poucas áreas de necrose frente ao tecido neoplásico viável. As áreas de necrose de coagulação presentes em todas as amostras sugerem morte hipóxica das células tumorais, provavelmente em consequência de infiltração vascular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1991).

Apesar dos grupos experimentais apresentarem as mesmas características histológicas, os grupos tratados com estrógeno apresentaram maior número de mitoses e menor índice apoptótico (fig. 6C), isso ocorre porque esse hormônio apresenta a função de induzir mitoses em células iniciadas (LEE e LEE, 2001), além de interferir na expressão do gene *bcl-2*, que controla o processo de apoptose. Sabe-se que, em células tumorais, a apoptose ou morte celular programada geneticamente é atrasada e que a concentração do estrogênio é responsável pelo crescimento tumoral (SUH *et al.*, 2003).

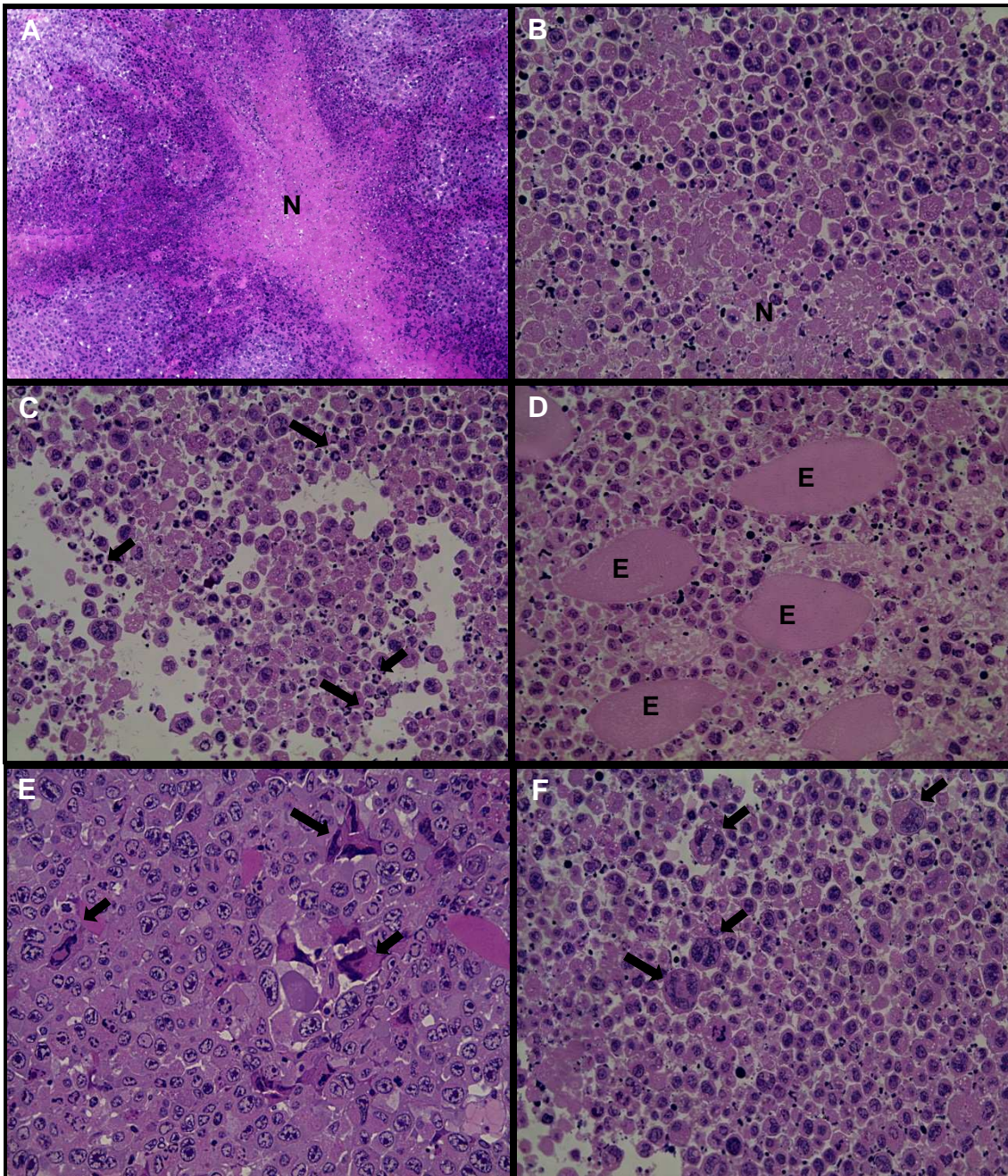


Figura 6. Fotomicrografia do Tumor de Ehrlich. A- Extensa área de necrose (N). B- Necrose de coagulação (N). C- Células em apoptose (setas). D- Área com edema (E). E- Presença de células em mitose atípica (setas). F- Células gigantes e multinucleadas (setas). Fig. A: 100X; Fig. (B, C, D, E e F): 400X. Hematoxilina-Floxina.

Análise de sobrevida

A análise de sobrevida é a medida mais frequentemente usada para avaliar o tratamento do câncer. Em nosso exemplo foi utilizada para comparar o tempo livre

de progressão do tumor entre os grupos de tratamento até que ocorresse a morte dos animais.

Na figura 7 pode-se observar a sobrevida cumulativa dos animais dos grupos experimentais em função do tempo. O grupo A apresenta uma taxa de sobrevida de 86% no 10º dia e 21% no 11º dia, já o grupo B apresenta uma sobrevida de 86% no 11º dia. Quanto ao grupo C, observou-se uma taxa de sobrevida de 86% no 8º dia, 71% no 9º dia, 57% no 10º dia e 43% a partir do 11º dia, enquanto que no grupo D a taxa de sobrevida foi de 86% no 10º dia e 71% no 11º dia. O grupo E apresentou uma sobrevida de 86% a partir do 9º dia e o grupo F apresentou sobrevida de 86% a partir do 11º dia. Pôde-se observar que houve diferença estatística significativa entre o grupo A e o grupo G ($p=0,0045$) e o grupo C e o grupo G ($p= 0,0145$).

Nossos resultados são similares aos encontrados por Baiocchi *et al.* (1986), nos quais o tratamento com estrógeno acelerou o óbito entre os camundongos machos portadores do tumor de Ehrlich, em relação ao grupo controle tratado com solução fisiológica. Em contrapartida estudos realizados por Lissoni *et al.* (1999), em que foi avaliado os efeitos da administração da melatonina sobre a toxicidade e eficácia de várias combinações quimioterapêuticas em 250 pacientes com tumores sólidos metastáticos, a taxa de sobrevivência de 1 ano e a taxa de regressão do tumor foi significativamente maior no doentes tratados com melatonina do que naqueles que receberam apenas quimioterapia.

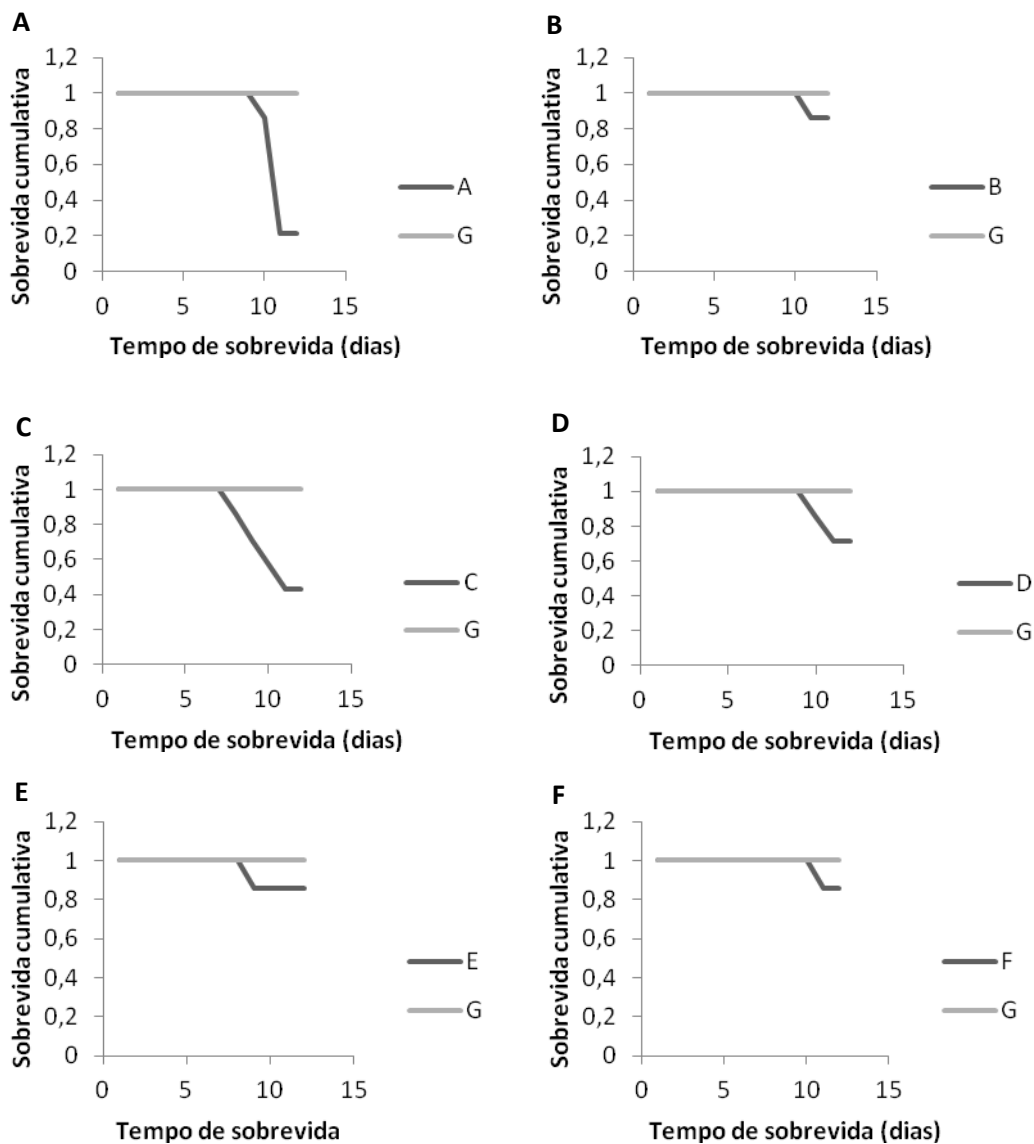


Figura 7. Sobrevida cumulativa dos animais nos grupos experimentais após o implante do tumor. A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que:

1. O estrógeno e a melatonina, através da atuação no ovário, interferem nos mecanismos regulatórios dos processos de crescimento do tumor de Ehrlich;

2. Alterações nos padrões de ritmicidade para a melatonina assim como para o estrógeno, pode predispor os organismos à uma maior incidência de tumor;
3. O estrógeno exógeno atua como promotor do crescimento tumoral e a melatonina inibe o crescimento do tumor de Ehrlich sólido;
4. A melatonina exógena reduz o crescimento tumoral mesmo em animais tratados com estrógeno, sendo de fundamental importância no tratamento de tumores estrógeno-dependentes;
5. A administração de estrógeno reduz a sobrevida de animais implantados com tumor de Ehrlich.

AGRADECIMENTOS

À PPGBA/UFRPE e CAPES pelo auxílio financeiro e Bolsa de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

- ALEANDRI, V.; SPINA, V.; MORINI, A. The pineal gland and reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 225-235, 1996.
- BAIOCHI, E.; BIGONHA, J. G.; HEYMANN, R. E.; FEDER, D.; CABRAL, M.; ZYNGIER, SZULIM BER. Estrógeno em tumor de Ehrlich: estudo da sobrevida e avaliação da resposta imunológica / Estrogen in Ehrlich's tumor survival study and immune response evaluation. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 9, p. 22-7, 1986.
- BARACAT, E. C.; SOARES JR., J. M.; LANG, C. E.; SIMÕES, M. J.; HAIDAR, M. A.; DAIR, E. I.; RODRIGUES DE LIMA, G.; MARKUS, R. Ovarian morphology of adult rats submitted to continuous light or pinealectomy after melatonin administration. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 70, n. 1, p. 132-133, 2000.
- BLASK, D. E.; HILL, S. M. Effects of melatonin on cancer: Studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. **Journal of Neural Transmission**, v. 21, p. 433-449, 1986.
- 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 en vue d'un traitement par radiothérapie. **Médecine Nucléaire**, v. 33, p.440–449, 2009.
- BRUNCKHORST, C. S.; VUONO, L.; BARNABE, R. C. Interrupção eletiva da gestação em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 37, n. 3, p 450-9, 2000.
- CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n. 61, p. 56-63, 2006.

- 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 JÚNIOR, 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**, v. 44, p. 217-223, 2011.
- COS, S.; GONZALEZ, A.; MARTINEZ-CAMPA, C.; MEDIAVILLA, M. D.; ALONSO-GONZALEZ, C.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Estrogen-Signaling Pathway: A Link Between Breast Cancer and Melatonin Oncostatic Actions. **Cancer Detection and Prevention Journal**, v. 30, n. 2, p. 118-28, 2006.
- COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
- DAIR, E. L.; SIMOES, R. S.; SIMOES, M. J.; ROMEU, L. R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; HAIDAR, M. A., BARACAT, E. C.; SOARES JUNIOR, J. M. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertil Steril**, v. 89, p.1299-305, 2007.
- EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 663-669, 2004.
- 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**, v. 48, p. 6121-6126, 1988.
- KATZ, M.; MARPEGAN, L.; BEKINSCHTEIN, T. Ritmos diários y circadianos en el sistema inmunológico. In: GOLOMBEK, d. **Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad**. Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes Ediciones.
- LEE, D. S.; LEE, S. H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. **FEBS Letters**, v. 501, n. 1, p. 84-86, 2001.
- LISSONI, P.; BARNI, S.; MANDALA, M.; ARDIZZOIA, A.; PAOLOROSSO, F.; VAGHI, M.; LONGARINI, R.; MALUGANI, F.; TANCINI, G. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. **European Journal of Cancer**, v. 35, n.12, p. 1688-1692, 1999.
- LUBOSHITZKY, R.; HERER, P.; SHEN-ORR, Z. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion in hyperandrogenic women: the effect of cyproterone acetate/ethinyl estradiol treatment. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 112, n. 2, p. 102-7, 2004.
- LUNENFELD, B. Endocrinology of the aging male. **Minerva Ginecologica**, v. 58, n.2, p. 153-170, 2006.
- 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 Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 321-4, 2009.
- MARTINEZ-CAMPA, C.; GONZÁLEZ, A.; MEDIAVILLA, M. D.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J.; COS, S. Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast

- cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 94, n. 3, p. 249-254, 2005.
- 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**, v. 18, n. 2, p.133-153, 2007.
- NAIR, R.; JUNANKAR, S.; OTOOLE, S.; SHAH. J.; BOROWSKY, A. D.; BISHOP, J. M.; SWARBRICK, A. Redefining the expression and function of the inhibitor of differentiation 1 in mammary gland development. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. 11947, 2010.
- OLIVEIRA, K.S. Síndrome do resto ovárico. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 273-4, 2007.
- PALERMO-NETO, J.; MASSOCO. C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**, v. 17, p. 43-54, 2003.
- PAPKOFF, H.; GOSPODAROWICZ, D.; LI, C. H. Purification and properties of ovine follicle stimulating hormone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 120, n. 434-439, 1967.
- PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.
- PRATA-LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonina on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 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.
- RAM, P. T.; KIEFER, T.; SILVERMAN, M.; SONG, Y.; BROWN, G.M.; HILL, S. M. Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 141, p. 53-64, 1998.
- RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; LEVIN, E. R. Plasma membrane estrogen receptors signal to anti-apoptosis in breast cancer. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 1434–1447, 2000.
- 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**, v. 61, n. 4, p. 679-684, 2000.
- REITER, R. J. Pineal control of seasonal reproductive rhythm in male golden hamsters exposed to natural daylight and temperature. **Endocrinology**, V. 92, P. 423-430, 1973.
- REITER, R. J. Pineal melatonin cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Society for Endocrinology**, v. 12, n. 2, p. 151-180, 1991.
- RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, p. 89-96, 2006.

- SANTOS, K. R. P.; TEIXEIRA, A. A. COELHO.; TEIXEIRA, V. W.; SILVA NETO, E. J. Análise Histológica do Ovário de Ratas Submetidas à Ausência de Luz. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, n. 3, p. 269-276, 2006.
- SCHMIDT, B. M.; GERDES, D.; FEURING, M.; FALKENSTEIN, E.; CHRIST, M.; WEHLING, M. Rapid, nongnomic steroid actions: A new age? **Frontiers Neuroendocrinology**, v. 21, n. 1, p. 57-94, 2000.
- SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.
- 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* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.
- 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**, v. 108, p. 339-350, 2008.
- SUH, K. S.; KOH, G.; PARK, C. Y.; WOO, J. T.; KIM, S. W.; KIM, J. W.; PARK, I. K.; KIM, Y. S. Soybean inhibit tumor necrosis factor α -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. **phytochemistry Reviews**, v. 63, p. 209-215, 2003.
- TORRES, S. M. P. S.; SIMÕES, R. S.; BARACT, M. C. P.; GOMES, R. G. T.; SOARES JUNIOR, J. M.; CARBONEL, A. A. F.; BARACT, E. C. Histomorfometria da mama de ratas tratadas com estrogênio e/ou progestagênio. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 2, p. 177-181, 2011.
- VALADARES, A. L.; PINTO-NETO, A. M.; CONDE, D. M.; OSIS, M. J.; SOUSA, M. H. Depoimentos de mulheres sobre a menopausa e o tratamento de seus sintomas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 4, p. 299-304, 2008.
- VICELLI, T. J.; GURGEL, M. S. C.; ALVARENGA, M. Histologia mamária após o uso de esteroides sexuais – estudo em ratas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 369-374, 2006.
- WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological method for morphometrics cytology. **Journal of Cell Biology**, v. 30, p. 23-38, 1966.
- ZUCCARI, D. A.; CAMPOS, P.; SANTANA, A. E.; ROCHA, SOUSA, N. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadela – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n. 32, p. 50-5, 2001.