



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

**Ana Paula Castor Batista**

**Ação anticancerígena da melatonina sobre a proliferação de células do carcinoma colônico humano (caco-2) e células obtidas de um modelo murino do tumor ascítico de Ehrlich**

**Recife 2013**

**Ana Paula Castor Batista**

**“Ação anticancerígena da melatonina sobre a proliferação de células do carcinoma colônico humano (caco-2) e células obtidas de um modelo murino do tumor ascítico de Ehrlich”**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Concentração Morfofisiologia Animal.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Co-orientadores:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paloma Lys de Medeiros**

**RECIFE 2013**

**Ana Paula Castor Batista**

**“Ação anticancerígena da melatonina sobre a proliferação de células do carcinoma colônico humano (caco-2) e células obtidas de um modelo murino do tumor ascítico de Ehrlich”**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em \_\_\_\_ de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

---

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) - UFRPE**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE**

---

**Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões - UNIFESP**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paloma Lys de Medeiros- UFPE**

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Alves – CpqAM-FIOCRUZ**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ti meu Deus, por iluminar e por abrir todos os meus caminhos, por sua fiel ajuda em cada etapa da minha vida e por fazer com que cada obstáculo seja fácil de atravessar.

Ao meu Pai Vicente, que se encontra ao lado de Deus, agradeço sempre por seu amor e dedicação até em meus sonhos. A minha mãe Diana, querida e amada, agradeço por sua luta pela minha formação.

A minha filha Maria Sara (Presente de Deus), que é tão pequenininha, mas já é tudo em minha vida e com seu sorriso só me dá forças para lutar e atravessar as barreiras da vida.

A minha Irmã Vânia, agradeço por ser tão companheira, amiga e por fazer parte da minha vida, me apoiando em cada momento e sempre me dando bons conselhos.

Ao meu amado Marido Junior, te agradeço por toda sua compreensão, por sua ajuda e por escutar os meus desabafos. Agradeço sempre a Deus por você existir em minha vida.

A minha irmã mais velha, Verônica, agradeço por seus bons conselhos. Aos meus queridos sobrinhos Pedro e Carlos, amo muito vocês.

Aos meus orientadores, Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira, agradeço por toda paciência, amizade e por toda a orientação recebida desde a graduação.

A minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Paloma Lys de Medeiros, agradeço por toda amizade e por está sempre disposta a me ajudar.

Aos Professores Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos, agradeço pela ajuda, pela amizade, pelo aprendizado. Vocês tornaram meu trabalho mais alegre.

Aos LIKA Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE e o centro de pesquisas Ageu Magalhães- CPqAM/FIOCRUZ- PE, por abrir suas portas e facilitar meu estudo.

Ao Diretor do LIKA Dr. José Luiz de Lima Filho.

As professoras Dra. Teresinha Gonçalves da Silva e Dra. Eliete Cavalcanti Silva, agradeço por toda atenção, ajuda e confiança.

Aos companheiros do LIKA: Rafael, Dyana, Marília e Gabriel. Muito Obrigada pela ajuda e troca de conhecimentos.

As minhas amigas do laboratório de histologia: Hilda, Ismaela e Welma. Obrigada por toda amizade e ajuda, espero que isso nunca acabe. Amo vocês.

Meus sinceros agradecimentos aos queridos companheiros e ex-companheiros do laboratório de histologia: Ana Cláudia e Solange (adoro vocês), Ana Janaina, Rose, Carina, Lilian, Clovis, Carol, Fernanda Miguel, Fernanda Ângelo, Sandra, Aline, Franklin, Cris e Thiago.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e o Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, área de Histologia por ter cedido as instalações para a elaboração do trabalho. A CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Pernambuco e aos Departamentos de Antibióticos e de Histologia e Embriologia por também terem cedido as instalações para a elaboração do trabalho.

Às cobaias que cederam involuntariamente suas vidas!

## RESUMO

Dentre os modelos tumorais podemos destacar o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e as células caco2. Esses modelos experimentais constituem um recurso útil para o estudo da gênese tumoral, por permitir quantificação e análise do crescimento e regressão da massa tumoral. Dentre as substâncias oncostáticas a melatonina tem mostrado eficácia em limitar a proliferação das células tumorais. Assim a pesquisa investigou a ação da melatonina sobre a proliferação de células do carcinoma colônico humano (caco-2) e células obtidas de um modelo murino do tumor ascítico de Ehrlich. Avaliou-se o crescimento tumoral, tempo e percentual de sobrevivência, ultraestrutura e metástase das células TAE em camundongos submetidos ou não a pinealectomia, utilizando-se as dosagens de 150 e 300 $\mu$ g/30g peso do animal de melatonina por 12 dias consecutivos. Para as células caco2 investigou-se o efeito de diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e 0,78 $\mu$ g/mL), *in vitro*, de melatonina com a finalidade de verificar a citotoxicidade e a ultra-estrutural. De acordo com os resultados verificou-se que a circunferência abdominal dos camundongos tratados com melatonina foi reduzida significativamente, sendo mais expressiva na dosagem de 300 $\mu$ g. Houve redução significativa, independente da dosagem, do volume do líquido ascítico e da viabilidade das células TAE, além do aumento do tempo de vida dos animais. Ultra-estruturalmente as células TAE após tratamento com melatonina mostraram alterações morfológicas, com a superfície celular apresentando numerosas projeções, sendo algumas com bifurcação. No citoplasma evidenciou-se processo de degeneração das mitocôndrias e abundantes vacúolos. O núcleo apresentou-se fragmentado e bastante heterocromático sem evidências de nucléolo. A análise histopatológica dos órgãos revelou metástase nos pulmões e rins, apenas nos animais dos grupos controle. Nos pulmões foram evidenciadas células tumorais nos alvéolos e bronquíolos. Nos rins evidenciou-se a presença das células tumorais tanto na região cortical como também na região medular. Não foi observada metástase no fígado, intestino delgado e intestino grosso em nenhum dos animais dos

grupos experimentais. A citotoxicidade foi inversamente proporcional às concentrações de melatonina, sendo a concentração 0,78 µg/mL a que causou maior toxicidade nas células caco-2, seguida da concentração 1,56 µg/mL, e a concentração de 50 µg/mL foi a que apresentou a menor citotoxicidade não diferindo das demais concentrações e do controle. O aspecto ultra-estrutural das células tratados com melatonina não mostrou a formação de monocamadas. No grupo em que as células caco2 apresentaram menor citotoxicidade (50 µg/mL de melatonina) foi visualizado alteração na morfologia celular, presença de microvilosidades, núcleo volumoso com áreas heterocromáticas periféricas, citoplasma com numerosos vacúolos, degeneração mitocondrial, ribossomos abundantes e redução das reservas de glicogênio. No entanto, nos tratamentos que mostraram média e alta citotoxicidade (1,56 e 0,78 µg/mL de melatonina, respectivamente), as células caco2 apresentaram-se também com morfologia alterada, porém com características de células em degeneração pela presença de numerosos vacúolos e ausência de microvilosidades. Foi observado ainda ausência de glicogênio, redução significativa de ribossomos, degeneração mitocondrial, vacúolos, às vezes contendo substância elétron-lucente, além de fragmentação nuclear. Assim, podemos concluir que doses diárias de 150 e 300µg por 30g de peso do animal de melatonina por 12 dias consecutivos teve uma atividade oncostática bastante efetiva sobre as células TAE e que concentrações de 1,56 e 0,78 µg/mL de melatonina promove citotoxicidade nas células caco2.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pineal, metástase, atividade oncostatica, ultraestrutura, citotoxicidade





## ABSTRACT

Among the tumor models can highlight the Ehrlich ascites tumor (TAE) cells and CaCO<sub>2</sub>. These experimental models are a useful resource for the study of tumorigenesis by allowing quantification and analysis of growth and regression of the tumor mass. Among the substances oncostáticas melatonin has shown effectiveness in limiting tumor cell proliferation. Thus the study investigated the action of melatonin on cell proliferation of human colon carcinoma (Caco-2) cells obtained from a murine model of Ehrlich ascites tumor. We evaluated tumor growth, time and percentage of survival, metastasis and ultrastructure of cells in mice undergoing TAE pinealectomy or not, underwent dose of 150 and 300 µg/30g animal weight of melatonin for 12 consecutive days. For cells CaCo-2 investigated the effect of different concentrations (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 and 0.78 mg / mL) of melatonin in order to check the cytotoxicity and ultrastructural . According to the results it was found that the abdominal circumference of melatonin-treated mice was significantly reduced, more significant at a dose of 300 µg. Significant reduction, regardless of the dose, the volume of ascites fluid and cell viability TAE, and increasing the lifespan of the animals. Ultrastructurally TAE cells after treatment with melatonin showed morphological changes, with the cell surface displaying numerous projections, and some with fork. In the cytoplasm was evidenced process of degeneration of mitochondria and abundant vacuoles. The nucleus appeared quite fragmented and without evidence of heterochromatic nucleolus Histopathology of organs showed metastasis in the lungs and kidneys, only the control group animals. Lung tumor cells were found in the alveoli and bronchioles. Kidney revealed the presence of tumor cells both in cortical region but also in the spinal region. No metastasis was observed in liver, small intestine and large intestine in any of the animals of the experimental groups. Cytotoxicity was inversely proportional to the concentrations of melatonin, the concentration 0.78 µg/mL to that caused greater toxicity in Caco-2 cells, followed by concentration 1.56 µg/mL, and the concentration of 50µg/mL was that showed the lowest cytotoxicity not differing from the other concentrations and control. The ultrastructural aspect of cells treated with melatonin did not show formation of monolayers. In the group in which cells showed less cytotoxicity CaCo-2 (50 µg /mL melatonin) was visualized changes in cell morphology, presence of microvilli, large nucleus with peripheral heterochromatin areas, with numerous cytoplasmic vacuoles, mitochondrial degeneration, abundant ribosomes and reduction of reserves glycogen. However, treatments that showed cytotoxicity medium and high (1.56 and 0.78 µg/ml of melatonin, respectively), CaCo-2 cells also showed altered morphology, but with characteristics degeneration of cells in the presence of numerous vacuoles and absence of microvillus. It was also observed absence of glycogen, a significant reduction of ribosomes, mitochondrial degeneration, vacuoles, sometimes containing electron-lucent substance,

and nuclear fragmentation. Thus, we can conclude that daily doses of 150 and 300  $\mu\text{g}/30\text{g}$  of body weight of melatonin for 12 consecutive days have a very effective oncostática activity on cells TAE and that doses of 1.56 and 0.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Melatonin promotes cytotoxicity in cells CaCo-2

KEYWORDS: Pineal, metastasis, oncostatica activity, ultrastructure, cytotoxicity

## SUMÁRIO

Capítulos		Pág.
1	INTRODUÇÃO.....	12
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
2	Ultraestrutura das células do tumor ascético de Ehrlich, tempo de vida e metástase em órgãos de murino, após a administração exógena de melatonina.....	24
	RESUMO.....	25
	INTRODUÇÃO.....	26
	METODOLOGIA.....	28
	Local de realização dos experimentos.....	28
	Obtenção e manutenção dos animais.....	28
	Grupos experimentais.....	28
	Pinealectomia.....	29
	Obtenção das células tumorais.....	30
	Teste de viabilidade celular e do volume inoculado.....	31
	Inoculação nos animais.....	32
	Tratamento com melatonina.....	32
	Avaliação do crescimento tumoral.....	33
	Análise do tempo de vida.....	34
	Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
	Microscopia óptica de luz.....	35
	Análise estatística.....	35
	RESULTADOS.....	36
	DISCUSSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	47
3	Efeito da melatonina sobre a ultraestrutura das células Caco-2 <i>in vitro</i> .....	53
	RESUMO.....	54
	INTRODUÇÃO.....	55

METODOLOGIA.....	57
Local de realização dos experimentos.....	57
Cultivo celular.....	57
Melatonina.....	57
Atividade da melatonina sobre as células caco-2.....	57
Microscopia eletrônica de transmissão.....	58
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	62

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

O termo câncer é utilizado para designar o crescimento desorganizado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, sendo esse processo denominado de metástase. Quando a atividade mitótica é muito intensa, essas células tendem a ser bastante agressivas tornando-se neoplasias malignas, que constituem a terceira maior causa de morte no Brasil. Caso contrário, se a multiplicação é lenta, tornam-se tumores benignos que raramente constituem risco de morte (INCA, 2006).

Acredita-se que o mais antigo achado da ocorrência desta doença em seres humanos, refere-se à descrição encontrada em papiros do antigo Egito, datados de 1500 a.C, referentes a úlceras cutâneas que possuíam resistência a tratamentos. Ao longo dos anos, marcos importantes no estudo do câncer puderam ser registrados, com a classificação de Galeno, no ano de 150 de nossa era, que incluía os hoje conhecido tumores benignos e malignos (DAGLI, 1989).

A carcinogênese é um processo complexo que envolve muitos genes, de forma especial os que estão diretamente envolvidos na estabilidade e no reparo do DNA, crescimento celular, imunidade e quimoresistência as drogas. Genes que normalmente promovem o crescimento e a diferenciação da célula são chamados de proto-oncogenes, estes genes quando mutados, amplificados ou translocados, transformam-se em oncogênes, que são diretamente responsáveis pela produção de onco-proteínas causando proliferação anormal das células (FRANCO et al., 2010).

Geneticamente, a célula possui os genes proliferativos, que são responsáveis pela divisão e diferenciação celular e os genes antiproliferativos, que são responsáveis pela supressão de tumores, inibindo o ciclo celular ou induzindo a morte programada (apoptose). Desta forma, a ocorrência de transformações celulares podem originar um desequilíbrio fisiológico (MADELAINÉ; ZALCMAN, 2005). As células que possuem uma rápida capacidade de se dividirem são mais susceptíveis a carcinogênese, devido a menor oportunidade de reparação do DNA, antes da divisão celular (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

A metástase depende de uma série de interações entre a célula tumoral e os tecidos do hospedeiro, podendo ser de três tipos: 1. Por implantes através de cavidades naturais; 2. Por via sanguínea ou 3. Via linfática. Já a invasão local refere-se às neoplasias benignas que podem invadir os tecidos por contiguidade, ultrapassando inclusive os limites anatômicos (FRANCO et al., 2010).

A origem do câncer pode ser favorecida por agentes biológicos (vírus-HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV58 e HBV, EBV, HTL), agentes físicos (radiação ionizante e raios ultravioleta) agentes químicos presentes em alimentos – aflotoxinas (FRANCO et al., 2010).

Vários modelos experimentais têm sido propostos na área da oncologia experimental para o entendimento de alguns mecanismos tais como: biologia tumoral, volume líquido ascítico e tempo médio de vida dos animais. Esses modelos fornecem informações da interação entre o tumor e seu hospedeiro, além de permitir o estudo das características referentes ao crescimento neoplásico e sobre os mecanismos de disseminação (RIZZO, 2000).

Dentre os modelos tumorais podemos destacar o tumor ascítico de Ehrlich descrito inicialmente como adenocarcinoma mamário espontâneo em camundongos (MATSUZAKI et al., 2003; PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003). Este modelo experimental de tumor tem sido um recurso útil principalmente por permitir uma padronização do número de células a serem inoculadas, quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral. Esse tumor tem a capacidade de crescimento rápido no líquido ascítico após sua inoculação na cavidade peritoneal em roedores (DAGLI; LORIS; GUERRA, 2002). Além disso, esse fluido tumoral pode também ser inoculado por via intravenosa, facilitando o estudo sobre migração de células e desenvolvimento de metástases (RIZZO, 2000).

Inicialmente o tumor de Ehrlich foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Posteriormente, surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (DAGLI, 1989, DAGLI; LORIS; GUERRA, 2002). O termo ascite (grego *askites* significa bexiga, barriga ou bolsa) é definido como sendo um acúmulo de líquido na cavidade peritoneal. Esta patologia ocorre devido a um aumento da pressão venosa, a qual se estende aos capilares do peritônio causando a transudação de líquido para o abdome ou quando aumenta a pressão nos sinusóides hepáticos (5 a 10 mm/Hg) podendo haver a transudação pela própria superfície do fígado. Outra causa da ascite pode ser a diminuição da pressão coloidosmótica do plasma, porém às vezes as três condições contribuem para o desenvolvimento dessa patologia (HAUSBERGER et al., 2001).

O tumor de Ehrlich, quando injetado intraperitonealmente, tem a capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico e quando injetadas em tecido subcutâneo, origina o tumor sólido. Após implantação na cavidade peritoneal em camundongos saudáveis tem-se a formação de líquido ascítico tumoral (DAGLI, 1989; SAAD-HOSSNE; HOSSNE; PRADO, 2004). Estima-se que 10% de todos os casos de ascite em humanos, são de origens neoplásicas, sendo a maioria destas provenientes de tumores gastrointestinais e ovarianos (SAAD-HOSSNE; HOSSNE; PRADO, 2004).

A vantagem de se utilizar o tumor de Ehrlich em modelos experimentais é o fato de que ele pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra esse tipo de tumor (BERGAMI-SANTOS; MARIANO; BARBUTO, 2004).

Estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, da eficácia de concentrações fisiológicas e administração exógena do hormônio melatonina têm mostrado excelentes resultados na prevenção e na redução do crescimento tumoral, apesar da maioria dos trabalhos resultarem da experimentação animal (SAUER; DAUCHY; BLASK, 2001; BLASK et al., 2002; MEDEIROS et al., 2003), estudos em humanos (LISSONI et al., 2003) com uma variedade de diferentes cânceres também sugerem uma ação oncostática da melatonina (REITER et al., 2003; BARTSCH; BARTSCH, 2006; JUNG; AHMAD, 2006).

Os efeitos da melatonina sobre o tumor ascítico de Ehrlich são bastante contraditórios. Bartsch; Bartsch (1981) foram os primeiros a registrarem um



duplo efeito da melatonina sobre esse tumor, por observarem tanto crescimento como inibição. Catrina et al. (2001) relataram que o tratamento com a melatonina diminuiu em 32,5% a taxa de sobrevivência de camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich. Alguns autores citam ainda que a melatonina tem um efeito promotor no crescimento de outros tipos de tumores tanto *in vivo*, bem como *in vitro* (BARTSCH et al. 2000). Porém, Li; Xu (1997) e El-Missiry; El-Aziz (2000) mostraram efeitos benéficos da melatonina sobre a evolução do tumor de Ehrlich. Esses efeitos contraditórios da melatonina em alguns tipos de tumores podem sugerir diversos modos de ação desse hormônio sobre a gênese tumoral, ou que exista alguma substância oncostática, ainda desconhecida, na glândula pineal (CATRINA et al., 1999; 2001).

A melatonina, N-acetil-5-methoxy-triptamina, é uma molécula pequena lipofílica secretada principalmente pela glândula pineal e sua síntese mostra um padrão circadiano. Muitos receptores da melatonina são encontrados em diversos órgãos o que explica suas múltiplas funções biológicas na re-sincronização de ritmos, indução do sono, vaso regulação, e até mesmo imunomoduladora (HUETHER, 1993). Além da glândula pineal, a melatonina é também sintetizada na retina, medula óssea, trato gastrointestinal, e pelos linfócitos T (WILKINSON, 1991).

Embriologicamente esta glândula se origina de um adelgaçamento e evaginação da lâmina do teto do diencéfalo, sendo constituída por dois tipos celulares: os pinealócitos ou células principais, que constituem 95%, e as células intersticiais ou astrócitos, que constituem 5% do órgão (REITER, 1983).

Os pinealócitos captam o triptofano do sangue ao mesmo tempo em que a noradrenalina interage com receptores adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos e desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares. O triptofano é convertido para serotonina através da hidroxilação via triptofano 5-hidroxilase e descarboxilação via aminoácido aromático descarboxilase. A serotonina é então convertida em N-acetil-serotonina pela enzima arilalquilamina N-acetil transferase. Por fim, a N-acetil serotonina é metilada para a forma de melatonina pela enzima hidroxí-indole-O-metil transferase (HIOMT) (TAMURA et al., 2008)

A síntese da melatonina exibe um ritmo circadiano que é gerado por um relógio biológico localizado no núcleo supra-quiasmático (SCN) no hipotálamo. O relógio do SCN é regulado 24-horas do dia pelo ciclo claro-escuro natural. Os sinais de luz percebidos pela retina seguem direto para o SCN que então envia sinal para o gânglio cervical superior, e este para a glândula pineal, reduzindo assim a síntese rítmica da melatonina, a qual é estimulada pela escuridão (LANOIX et al., 2008).

A eficácia da melatonina em limitar a proliferação das células tumorais é dependente da hora do dia de sua administração, pois se for realizada no final da fase clara tem melhor efeito (SAUER; DAUCHY; BLASK, 2001). Experimentos com variações no fotoperíodo para investigar o papel da melatonina em diversos tipos de tumores indicam que a presença de luz artificial à noite deve ter implicações no aumento dos casos de câncer (SCHERNHAMME; SCHULMEISTE, 2004). Além disso, com a evolução da idade, os níveis de melatonina diminuem o que pode contribuir para a maior

taxa de doenças oncológicas em pacientes mais velhos (VIJAYALAXMI et al., 2004).

A literatura relata que a forma de ação pela qual a melatonina inibe a proliferação de células tumorais envolve diferentes mecanismos. No caso de hepatomas e câncer pulmonar a melatonina atua nos receptores específicos de membrana, na carioteca das células hepáticas, limitando o transporte de ácido linoléico (fator de crescimento tumoral) (BLASK et al., 2002). Sabe-se ainda que a melatonina é um potente agente antioxidante que regula vários processos fisiológico no fígado além de inibir o crescimento de hepatocarcinomas (BLASK; DAUCHY; SAUER, 2004).

Nos cânceres dependentes de estrógenos, a melatonina reduz a expressão gênica do receptor estrogênico (MOLIS; SPRIGGS; HILL, 1994). Outros mecanismos são representados pela capacidade da melatonina em reduzir a angiogênese (LISSONI et al., 2002), retardar a transição da fase G1 para a fase S (REITER et al., 2003) e atuar como antioxidante reduzindo consideravelmente os danos ao DNA pelos radicais livres (KARBOWNIK; REITER 2000; KARBOWNIK; TAN; REITER, 2000).

A grande incidência de câncer em todo mundo faz com que cada vez mais aumente as pesquisas e terapias, mais seguras e eficazes, para prevenção e combate do mesmo (OLIVEIRA; PINHEIRO; VALADARES, 2005). Apesar dos esforços despendidos, o sucesso no tratamento de determinados tumores tem se mostrado discreto, devido ao grau de agressividade da doença e aos mecanismos de disseminação das células neoplásicas, e principalmente pela toxicidade medular causada pelos agentes anti-neoplásicos devido à ausência de seletividade destes apenas para as células neoplásicas, o que

limita em muito o tratamento (RAFFERTY; HICKSON; LASHFORD, 1996; ASLANI et al., 2000; HUSSAR, 2001).

As células Caco-2 são bastante requeridas para estudos de absorção, pois a linhagem é originária do epitélio do cólon humano e exibe características estruturais e funcionais *in vitro* muito próximas às do epitélio normal (PINTO et al., 1983; VAN BEERS et al., 1995).

Em estudos de permeabilidade *in vitro* com células tumorais Caco-2, sugerem que a melatonina seja bem absorvida no trato gastrointestinal em seres humanos (YELESWARAM et al., 1997). Essas células são ainda pouco estudadas com relação à ação da melatonina, o que faz despertar o interesse sobre o efeito antioxidante desse hormônio e suas repercussões sobre a referida linhagem.

Apesar de vários trabalhos sugerirem a melatonina como um potencial agente anticâncer, não há provas clínicas suficientes para definir o verdadeiro potencial terapêutico desse hormônio no tratamento de cânceres em humanos, levantando a hipótese de que o mesmo possa apresentar reações adversas (BARTSCH et al., 2000; CATRINA et al., 2001). Portanto, é de fundamental importância à investigação de compostos ditos anti-neoplásicos com o objetivo de conhecer a real efetividade desses compostos sobre a gênese tumoral em modelos *in vivo* e *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASLANI, A.; SMITH, R.C.; ALLEN, B.J.; PAVLAKIS, N.; LEVI, J.A. The predictive value of body protein for chemotherapy-induced toxicity. **Cancer**. v. 88, p. 796-803, 2000.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. **J. Neural. Transm.** v. 52, p. 269-279, 1981.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; JAIN, A.K.; LAUMAS, K.R.; WETTERBERG, L. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. **J. Neural. Transm.** v. 52, n. 4, p. 281-94, 2000.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H. The anti-tumor activity of pineal melatonin and cancer enhancing life styles in industrialized societies. **Cancer Cause Control**. v. 17, p. 559–571, 2006.
- BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M.; Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life sci**. v. 35, p. 245-255, 2004.
- BLASK, D.E.; PELLETEIR, D.B.; HILL, S.M.; LEMUS-WILSON, A.; GROSSO, D.S.; WILSON, S.T.; WISE, M.E. Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the NMU mammary model of carcinogenesis: potential involvement of mechanism in vivo. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 117, p. 526–532, 2002.
- BLASK, D.E.; DAUCHY, R.T.; SAUER, L.A. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phyto-melatonin. **Carcinogenesis**, v.25, n.6, p.951-960, 2004.
- CATRINA, S.B.; CATRINA, A.I.; SIRZÉN, F.; GRIFFITHS, W.; BERGMAN, T.; BIBERFELD, P.; COCULESCU, M.; MUTT, V. A cytotoxic, apoptotic, low-molecular weight factor from pineal gland. **Life Sci**. v. 65: p.1047–1057, 1999.
- CATRINA, S.B.; CURCA E.; CATRINA, A.I.; RADU, C.; COCULESCO, M. Melatonin shortens the survival rate of ehrlich ascites-inoculated mice. **Neuroendocrinol. Lett.** v. 22, p. 432-434, 2001.
- DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: Estudo experimental. São Paulo, USP, 1989, p. 148. Dissertação (mestrado em medicina veterinária)- Universidade de São Paulo, 1989.
- DAGLI, M.L.Z; LORIS, S.C.S.; GUERRA, J.L. Effect of B- carotene on development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Sci**. v.71, p.717-724, 2002.
- EL-MISSIRY, M.A.; EL-AZIZ, A.F.A. Influence of melatonin on proliferation and antioxidant system in Ehrlich ascites carcinoma cells. **Cancer Letters**. v. 151, n. 2, p. 119-125, 2000.
- FRANCO, M.M.R.M.; MONTENEGRO, M.R.; BRITO, T.; BACCHI, C.E.; ALMEIDA, P.C. **Patologia Processos Gerais**. 5 ed. São Paulo: editora Atheneu, 2010. 277p.

HAUSBERGER, R.; DE BEM, R.S.; ALENCAR, B.L.; PEDRO SO, M.L.A.; BOARETTI, A.C.; MESSIAS-REASON, L.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. **J. Bras. Patol.** v.37, n.3, p. 187-196, 2001.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. **Experientia**, v.49, p. 665-670, 1993.

HUSSAR, D.A. New drugs 2000. **J. Am. Pharm. Assoc.** v. 41, n. 2, p. 229-272, 2001.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2006/ incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): 2006. Disponível em <http://www.inca.gov.br/publicações>.

JUNG, B.; AHMAD, N. Melatonin in cancer management: Progress and promise. **Cancer Res.** v. 66 p. 9789-9793, 2006.

KARBOWNIK, M.; REITER R.J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.225, n.1, p.9-22, 2000.

KARBOWNIK, M.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen delta-aminolevulinic acid. **Int. J. Cancer.** v. 88, p. 7-11, 2000.

LANOIX, D.; BEGHADADI, H.; LAFOND, J.; VAILLANCOURT, C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **J. Pineal Res.** v. 45, p. 50-60, 2008.

LI, J.C.; XU, F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. **Neurosignals.** v. 6, p. 77-89, 1997.

LISSONI, P.; MALUGANI, F.; MALYSHEVA, O.; KOZLOV, V.; LAUDON, M.; CONTI, A. Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose interleukin-2, melatonin and naltrexone: modulation of interleukin-2-induced antitumor immunity by blocking the opioid system. **Neuroendocrinol Lett.** v.23, p. 341-344, 2002.

LISSONI, P.; CHILELLI, M.; VILLA, S.; CERIZZA, L.; TANCINI, G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. **J. Pineal Res.** v.35, p.12-15, 2003.

MADELAINE, J.; ZALCMAN, G. Biology of bronchial cancers. **EMC-pneumol.** v. 2, p. 9-31, 2005.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; SALGADO-OLORIS, S.C.; GORNIK, S.L.; ZAIDAN DAGLI, M.L.Z. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sci.** v.74, n.5, p. 573-579, 2003.

MEDEIROS, P.L.; VALENÇA, M.M.; NASCIMENTO, S.C.; RODRIGUES, C.G.; CARNEIRO, C.M.M.; MARCHIORO, M.; BARBOSA, C.T.F. Ação da melatonina sobre as correntes macroscópicas de células H.Ep.-2. **Biol. Geral Exper.** v. 2, p. 9-17, 2003.

MOLIS, T.M.; SPRIGGS, L.L.; HILL, S.M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. **Mol. Endocrinol.** v. 8, p. 1681-1690, 1994.

OLIVEIRA, L.P.; PINHEIRO, R.C.; VALADARES, M.C. Avaliação da citotoxicidade da *Punica granatum* L. sobre células tumorais. **REF.** v. 2, n. 2, p. 150-152, 2005.

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

PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M.D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON- ASSMAN, P.; HAFFEN, K.; FOGH, J.; ZWEIBAUM, A. Enterocyte- like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biol. Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.

RAFFERTY, J.A.; HICKSON, I.; LASHFORD, L.S. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer Metastasis Rev.** v.15, p. 365, 1996.

REITER, R.J. The Pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. **Psychoneuroendocrinology**, v.8, p. 34-40, 1983.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; LEON, J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications. **Acta Biochim. Polon.** v. 50, p.1129–1146, 2003.

RIZZO, M.S. Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos. São Paulo, 2000, p.100. Tese (doutorado) Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia- USP.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.** v. 99, p. 1-13, 2003.

SAUER, L.A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D.E. Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288CTC-bearing and normal Buffalo rats via receptor-mediated signal transduction. **Life Sci.** v. 68, p. 2835-2844, 2001.

SAAD-HOSSNE; HOSSNE, W.S.; PRADO, R.G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: Estudo experimental *in vitro*. **Acta Cir. Bras.** v.19, p. 54-58, 2004.

SCHERNHAMMER, E.; SCHULMEISTER, K. Light at night and cancer risk. **Photochem. Photobiol.** v.4, p. 316-320, 2004.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TERRON, H.P.; FLORES, L.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and pregnancy in the human. **Reprod. Toxicol.** v. 25, p. 291-303, 2008.

VAN BEERS, E.H.; AL, R.H.; RINGS, E.H.H.M.; EINERHAND, A.H.C.; DEKKER, J.; BÜLLER, H.A. Lactase and sucrase- isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. **Biochem. J.** v. 308, p. 769-775, 1995.

VIJAYALAXMI; REITER, R.J.; TAN, D.X.; HERMAN, T.S.; THOMAS, C.R.J.R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** v. 3, p. 639-645, 2004.

YELESWARAM, K.; MCLAUGHLIN, L.G.; KNIPE, J.O.; SCHABDACH, D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. **J. Pineal Res.** v. 22 p.45–51, 1997.

WILKINSON, C.W. **Endocrine rhythms and the pineal gland.** In: RUCH, T.; PATTON, H.D. (editors): Physiology. Philadelphia, Saunders, v. 2, p.1239-1261, 1991.



## CAPÍTULO II

Ultraestrutura das células do tumor ascítico de Ehrlich, tempo de vida e metástase em órgãos de murino, após administração exógena de melatonina

Batista, A.P.C.<sup>1</sup>; Silva, T.G.<sup>2</sup>; Teixeira, A.A.C.<sup>3</sup>; Medeiros, P.L.<sup>4</sup>; Wanderley-Teixeira, V.<sup>3</sup>; Alves, L.C.<sup>5</sup>; Brayner, F.A.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda da pós graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. E-mail: paula\_castor@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: teresinha100@gmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. E-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br, alvaro@dmfa.ufrpe.br

<sup>4</sup> Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: pmedlys@gmail.com

<sup>5</sup>. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ – PE – Brasil. E-mail: [lcalves@cpqam.fiocruz.br](mailto:lcalves@cpqam.fiocruz.br) - [brayner@cpqam.fiocruz.br](mailto:brayner@cpqam.fiocruz.br)

Autor para correspondência

Professor Doutor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

**Resumo**

Um dos modelos utilizados para o estudo do câncer é o tumor ascítico de Ehrlich (TAE), devido a sua capacidade de crescimento em suspensão no líquido, permitir uma padronização do número de células a serem inoculadas, quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral. Dentre as substâncias oncostáticas a melatonina tem mostrado eficácia em limitar a proliferação das células tumorais. Entretanto, estudos mostraram efeitos contraditórios da melatonina sobre o TAE. Assim, a presente pesquisa investigou a ação da melatonina sobre o crescimento tumoral, tempo e percentual de sobrevivência, ultraestrutura e metástase das células TAE em camundongos submetidos ou não a pinealectomia. Os animais foram inoculados com  $5 \times 10^6$  células/mL e tratados ou não com melatonina exógena com doses de 150 e 300 $\mu$ g/30g de peso do animal, por 12 dias. A melatonina reduziu significativamente a circunferência abdominal, o volume do líquido ascítico e a viabilidade das células TAE, elevando os índices do tempo e percentual de sobrevivência dos camundongos. Ultraestruturalmente o tratamento com melatonina revelou modificações na forma das células com a superfície celular mostrando numerosas projeções, sendo algumas bifurcadas, vacuolização citoplasmática, degeneração mitocondrial e fragmentação nuclear, características peculiares da apoptose. A histopatologia não revelou metástase no fígado, intestino delgado e intestino grosso em nenhum dos animais dos grupos experimentais, entretanto este processo foi evidenciado nos pulmões e rins, sendo inibido pela administração da melatonina. Assim, concluímos que doses de 150 e 300 $\mu$ g/30g peso do animal de melatonina por 12 dias têm atividade oncostática bastante efetiva sobre as células TAE.

Palavras-chave: pineal, tumor, metástase, ultraestrutura, histopatologia

## 1. Introdução

A melatonina, um hormônio da glândula pineal, possui efeito antioxidante devido a sua natureza lipofílica e hidrofílica além da sua habilidade para passar todas as bio-barreiras com facilidade, e a sua disponibilidade para todos os tecidos e células (MARTINS, 2009). Devido ao seu aspecto antioxidante, estudos têm demonstrado o importante papel da melatonina no tratamento do câncer, apresentando uma inibição do crescimento de células malignas, tanto *in vivo* como *in vitro* (BARTSCH et al., 2001), além de inibir o crescimento de hepatocarcinomas (OHTA; KONGO; KISHIKAWA, 2003; OKATANI et al., 2003; CARRILLO-VICO et al., 2005).

A eficácia da melatonina em limitar a proliferação das células tumorais é dependente da hora do dia de sua administração, pois se for realizada no final da fase clara tem melhor efeito (SAUER; DAUCHY; BLASK, 2001). Experimentos com variações no fotoperíodo para investigar o papel da melatonina em diversos tipos de tumores indicam que a presença de luz artificial à noite deve ter implicações no aumento dos casos de câncer (SCHERNHAMME; SCHULMEISTE, 2004). Além disso, com a evolução da idade, os níveis de melatonina diminuem o que pode contribuir para a maior taxa de doenças oncológicas em pacientes mais velhos (VIJAYALAXMI et al., 2004).

Um dos modelos utilizados para o estudo do câncer é o tumor ascítico de Ehrlich (TAE), devido a sua capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico após a sua inoculação, além de permitir uma padronização do número de células a serem inoculadas, a quantificação do crescimento assim como a regressão da massa tumoral (DAGLI; LORIS; GUERRA 2002). Entretanto, estudos têm mostrado efeitos contraditórios da melatonina sobre o TAE. Bartsch; Bartsch (1981) foram os primeiros a

registrarem um duplo efeito da melatonina (3-4 $\mu$ g/g) sobre o TAE em camundongos, por observarem tanto crescimento como inibição, quando administrada pela manhã e no final da tarde, respectivamente. Catrina et al. (2001) relataram que o tratamento com a melatonina (250 $\mu$ g/animal) diminuiu em 32,5% a taxa de sobrevivência de camundongos inoculados com o TAE. Contudo, Li; Xu (1997) e El-Missiry; El-Aziz (2000) mostraram efeitos benéficos da melatonina (50mg/Kg) sobre a evolução do TAE.

Alguns autores citam ainda que a melatonina tem um efeito promotor no crescimento de outros tipos de tumores tanto *in vivo*, bem como *in vitro* (BARTSCH et al., 2000). Os efeitos contraditórios da melatonina em alguns tipos de tumores podem sugerir diversos mecanismos desse hormônio sobre a gênese tumoral (CATRINA et al., 1999; 2001). Assim, o presente trabalho teve como objetivo responder às seguintes indagações: a) animais pinealectomizados tratados ou não com melatonina exógena com doses diárias de 150 e 300 $\mu$ g por 30g de peso do animal promove redução do crescimento tumoral (volume e “morte” (inviabilidade) das células neoplásicas)? b) se positivo, ocorre interferência no tempo de vida? c) se positivo, ocorre alterações ultraestruturais nas células neoplásicas? d) se positivo ocorre metástase nos órgãos?

## **2. Metodologia**

**O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de Ética institucional de nº. 012/2012**

### *2.1. Local de realização dos experimentos*

A pesquisa foi desenvolvida, nos Laboratórios de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) da Fiocruz.

### *2.2. Obtenção e manutenção dos animais*

Foram utilizados 90 camundongos machos *Mus musculus* da linhagem Swiss/Uni, com aproximadamente 60 dias, obtidos do biotério do LIKA, pesando aproximadamente  $30 \pm 1$ g. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, com água e alimentação *ad libitum*, a uma temperatura de aproximadamente  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 012/2012.

### *2.3. Grupos experimentais*

Grupo I – Camundongos não pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com placebo;

Grupo II – Camundongos sham-pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com placebo;

Grupo III – Camundongos pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com placebo;

Grupo IV – Camundongos não pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com melatonina na dosagem de 150µg por 30g de peso do animal;

Grupo V – Camundongos sham-pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com melatonina na dosagem de 150µg por 30g de peso do animal;

Grupo VI – Camundongos pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com melatonina na dosagem de 150µg por 30g de peso do animal;

Grupo VII – Camundongos não pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com melatonina na dosagem de 300µg por 30g de peso do animal;

Grupo VIII – Camundongos sham-pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com melatonina na dosagem de 300µg por 30g de peso do animal;

Grupo IX – Camundongos pinealectomizados, inoculados com células TAE e tratados com melatonina na dosagem de 300µg por 30g de peso do animal;

#### **2.4. Pinelectomia**

A pinelectomia foi realizada nos animais previamente anestesiados com hidrocloridrato de quetamina (80 mg/kg, i.m.) e xilazina (6,0 mg/kg, i.p.). Em seguida, foi realizada a tricotomia e assepsia da área dorsal da cabeça. Uma incisão foi feita na linha média dorsal da cabeça desde a região interauricular até a região interorbitária. As abas de pele foram rebatidas, e assim mantidas; a fáschia subjacente e o perióstio raspado de modo a expor o osso. Com um micromotor de baixa rotação e uma broca de

dentista n°05, foi retirado um fragmento circular da calota de aproximadamente 4 mm de diâmetro, tendo como ponto central de referência o lambda. Este fragmento foi colocado em solução fisiológica a 0,9%.

Após a retirada do fragmento ósseo e conseqüentemente visibilização da junção do seio venoso sagital superior e transversal (em forma de Y), dois fios de nylon (3-0 Prolene), foram passados delicadamente por baixo do seio sagital, um próximo à confluência dos seios e o outro mais afastado deste ponto, de modo que uma vez tracionados, se obteve a ligadura deste seio (KUSZAK; RODIN, 1977).

Sob lupa estereoscópica, uma incisão foi realizada entre os dois nós e em seguida, o nó próximo à confluência foi afastado para visibilização e retirada da glândula pineal por intermédio de pinças adequadas (de relojoeiro). A seguir, o fragmento ósseo foi recolocado e a pele suturada. Após a retirada da pineal, esta foi fixada em líquido de Bouin e processada para inclusão em parafina para confirmação em microscopia de luz.

O mesmo procedimento foi realizado com os animais submetidos à sham-pinelectomia, porém sem a retirada da glândula pineal, com o objetivo de eliminar falsos resultados devido à ação do procedimento cirúrgico.

### *2.5. Obtenção das células tumorais*

Foi utilizado o tumor ascítico de Ehrlich obtidos de camundongos, mantidos pelo Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da UFPE. A manutenção do tumor *in vivo* foi realizada pela injeção intraperitoneal de  $10^7$  células a cada sete dias em camundongos receptores. Os animais portadores do tumor foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Após a assepsia da parede

abdominal com álcool iodado realizou-se laparotomia mediana, com retirada de todo o líquido ascítico possível, por meio de aspiração com seringa de 5 mL sendo o líquido transferido para um tubo de ensaio seco e estéril mantido sob refrigeração.

#### *2.6. Teste de viabilidade celular e cálculo do volume a ser inoculado*

Para contagem de células fez-se inicialmente uma diluição de 1:100. Com a finalidade de se determinar a viabilidade das células tumorais, à suspensão de células (0,9 mL) foi acrescido azul tripan (0,1 mL a 0,2%). Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e realizada a contagem percentual, sendo consideradas mortas (inviáveis) as células que incorporavam o corante e, vivas as que excluía o azul tripan. Somente as amostras com viabilidade acima de 95% foram utilizadas nos experimentos (SAAD-HOSSNE; SAAD-HOSSNE; PRADO, 2004). Foram contados o número de células totais da amostra e o número de células viáveis (não coradas) e em seguida feito o cálculo da porcentagem de viabilidade pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células viáveis} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ células totais}}$$

Para o cálculo do volume a ser inoculado utilizou-se a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} = X \cdot FD \cdot 10^4$$

Onde,

$N^{\circ}$  = Número de células por mL;

X = média de células viáveis;

FD- Fator de diluição utilizado;



$10^4$  - Fator de correção da câmara de Neubauer.

Em seguida, o volume foi calculado através da seguinte fórmula:

$$C_i.V_i = C_f.V_f$$

Onde,  $C_i$  - (concentração inicial),  $V_i$ - Volume inicial (a ser inoculado nos animais),  $C_f$  – Concentração final ( $25 \times 10^6$  células/mL),  $V_f$  - Volume final (volume do TAE necessário para inoculação em todos os animais dos grupos experimentais).

### *2.7. Inoculação nos animais*

Para indução do tumor ascítico nos animais, foram injetados 0,5 mL da solução de concentração  $25 \times 10^6$  células/mL de forma que cada animal recebeu  $5 \times 10^7$  células/mL do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). A inoculação foi realizada por via intraperitoneal nos camundongos.

### *2.8. Tratamento com melatonina*

A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) foi administrada em doses diárias de 150 e 300µg por 30g de peso do animal. Para tanto, a melatonina foi dissolvida em 0,02 mL de etanol e diluída em NaCl a 0,9% para uma concentração final de 5 e 10µg/mL, respectivamente. As injeções foram aplicadas via intraperitoneal, sempre no período das 18:00 às 19:00h. Nos animais do grupo controle foram injetados o mesmo veículo do hormônio (DAIR et al., 2008). A

melatonina foi administrada no dia seguinte a inoculação do TAE por um período de 12 dias.

### *2.9. Avaliação do crescimento tumoral*

Após doze dias da inoculação tumoral, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados utilizando cloridrato de quetamina (80 mg/kg, IM) e xilazina (6,0 mg/kg, IP). A circunferência abdominal foi medida com o auxílio de um paquímetro e em seguida, com auxílio de uma seringa de 10 mL foi coletado todo líquido ascítico da cavidade abdominal dos camundongos, o qual foi acondicionado em tubos Falcon de 15mL, para mensuração do volume.

Para a contagem das células presentes nesse líquido, foi retirada uma alíquota de 100µL do líquido ascítico e colocado em um ependorfrf contendo 100 µL de azul de tripan e 800 µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%). As células foram contadas em câmara de Neubauer usando a técnica de exclusão pelo azul de tripan.

O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento celular tumoral foi realizado por meio da fórmula: % de inibição do crescimento =  $100 \cdot (1-R/C)$ , onde R = número médio de células viáveis no grupo tratado e C = número médio de células viáveis no grupo controle (MBAREK et al., 2007).

### *2.10. Análise do tempo de vida*

Os cinco animais restantes de cada grupo foram acompanhados diariamente para avaliar a expectativa de vida para elaboração da curva de mortalidade. O ponto final do experimento foi determinado pela morte espontânea dos animais. O tempo médio de sobrevivência dos animais (MST) e a porcentagem de aumento de sobrevivência (%ILS) foram avaliados. A %ILS e MST foi calculada utilizando as seguintes equações (GUPTA et al., 2004):

$$\text{MST} = (\text{1}^{\text{o}} \text{ dia de morte} + \text{último dia de morte}) / 2$$

$$\text{ILS}(\%) = [(\text{MST grupo tratado} / \text{MST grupo controle}) - 1] \times 100$$

$$\text{T/C} (\%) = (\text{MST do grupo tratado} / \text{MST do grupo controle}) \times 100$$

De acordo com Gupta et al. (2004) e Orsolich et al. (2005) se o percentual do MST dos grupos tratados dividido pela média do tempo de sobrevivência do grupo controle (T/C) exceder 125% e o ILS exceder 25%, é um indicativo que a droga testada possui uma atividade antitumoral significativa.

### *2.11. Microscopia eletrônica de transmissão*

As amostras de células (pellets) para microscopia eletrônica de transmissão foram lavadas em tampão cacodilato pH 7,2, fixadas em 2% glutaraldeído e 4% Paraformaldeído. Após uma hora, o material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM, durante 60 minutos à temperatura ambiente no escuro. As células foram então

lavadas no mesmo tampão e desidratadas em acetona (série crescente) e incluídas em resina Epoxi. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila 5% por 40 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. A observação foi feita em um Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900.

### *2.12. Histopatologia*

Logo após o processo de eutanasia, os órgãos (pulmão, fígado, intestino e rins) foram fixados em formol tamponado a 10% e processados para inclusão em parafina e historesina. Os cortes em parafina foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), e os de historesina em Azul de Toluidina.

### *2.13. Análise estatística*

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. As análises de variância ( $P \leq 0,05$ ) foram realizadas pelo método ANOVA one way e teste Tukey-Kramer, utilizando-se o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 3.02.

### 3. Resultados

As médias e desvio padrão referentes à circunferência abdominal, volume do líquido ascítico, células TAE viáveis e tempo de vida dos animais constam na Tabela 1. De acordo com a análise estatística verificou-se que o tratamento com melatonina, interferiu nos parâmetros analisados. A circunferência abdominal dos camundongos tratados com melatonina reduziu significativamente em relação aos grupos controle. No entanto, na dosagem de 300µg por 30g de peso do animal a redução foi mais expressiva. A análise do volume do líquido ascítico, células viáveis do TAE e do tempo de vida dos animais, demonstraram que independente da dosagem de melatonina administrada ocorreu redução significativa no volume do líquido ascítico e das células viáveis do TAE e aumentou o tempo de vida dos animais.

A Tabela 2 mostra as médias e desvio padrão do tempo de sobrevivência (MST), porcentagem do aumento de sobrevivência (ILS) e do percentual do tempo de sobrevivência (T/C) dos camundongos dos grupos experimentais. Estatisticamente houve um aumento no tempo de sobrevivência dos animais tratados com melatonina, além de ter sido verificado que o T/C de todos os grupos tratados excedeu o percentual de 125% e que o ILS desses mesmos grupos, foi superior a 25%. Os maiores valores para esses dois parâmetros foram observados nos animais sem procedimento cirúrgico e tratados com melatonina em ambas as dosagens.

Ultra-estruturalmente as células tumorais dos grupos controle (GI, GII e GIII) caracterizaram-se por apresentarem núcleo volumoso, bastante eucromático e nucléolo bem evidente, além de vesículas nucleares elétron-luscentes dispersas no nucleoplasma. No citoplasma foi evidenciado pobreza de organelas, caracterizada por presença de

ribossomos livres e mitocôndrias pequenas, além de vesículas lipídicas e vacúolos. A superfície celular apresentou numerosas projeções filiformes (Figs. 1A, 1B, 1C e 1D).

O aspecto morfológico e ultraestrutural das células tumorais após tratamento com melatonina nas dosagens de 150 e 300µg dos grupos experimentais mostraram modificações na forma das células tumorais, com a superfície celular apresentando numerosas projeções, sendo algumas com bifurcação. No citoplasma evidenciou-se processo de degeneração das mitocôndrias e abundantes vacúolos. O núcleo apresentou-se fragmentado e bastante heterocromático sem evidências de nucléolo (Figs. 2A, 2B, 2C e 2D).

A análise histopatológica dos órgãos revelou metástase nos pulmões e rins, apenas nos animais dos grupos controle. Nos pulmões foram evidenciadas células tumorais nos alvéolos e bronquíolos (Figs. 3A, 3B e 3C). Nos rins evidenciou-se a presença das células tumorais tanto na região cortical como também na região medular (Figs. 3D, 3E, 3F e 3G). Não foi observada metástase no fígado (embora tenha sido observado aderências das células do TAE à cápsula), intestino delgado e intestino grosso em nenhum dos animais dos grupos experimentais (Figs. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F e 4G).

#### **4. Discussão**

Sabe-se que após serem inoculadas na cavidade peritoneal, as células TAE se dividem rapidamente, sendo o acúmulo de líquido proporcional ao processo de proliferação (ALTUN, 1996). O líquido ascítico é a fonte direta nutricional para as células tumorais e um aumento no seu volume seria um mecanismo para atender as exigências nutricionais de células tumorais em crescimento (PRASAD; GIRI 1994; VENU GOPAL et al., 2011). A sua produção é devida a liberação do fator de permeabilidade vascular, pelas células tumorais, o qual aumenta a pressão venosa, que se estende aos capilares do peritônio causando a transudação de líquido para o abdome (SENGER et al., 1983; HAUSBERGER et al., 2001). Assim, a redução do volume ascítico nos grupos tratados com melatonina na presente pesquisa acarretando na redução da circunferência abdominal e viabilidade das células TAE, refletiu no aumento da expectativa de vida dos animais, critério fundamental para indicar que uma droga possui uma atividade antitumoral significativa (GUPTA et al., 2004; ORSOLIC; KOSALEC; BASIC 2005). Esse fato pode está associado à inibição do aumento da permeabilidade vascular por este hormônio (LOTUFO et al., 2001; LOTUFO et al., 2006; KAUR et al., 2008).

Segundo Dima et al. (2000) as células TAE, quando analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão, apresentam núcleo volumoso de contorno irregular, com cromatina descondensada, nucléolos exuberantes e superfície celular recoberta por grande quantidade de pequenas projeções filiformes. No entanto, o tratamento com melatonina promoveu vacuolização citoplasmática, degeneração mitocondrial e fragmentação nuclear. Essas alterações ultraestruturais são compatíveis com o estabelecimento de um processo apoptótico nas células TAE (SPERANDIO et

al., 2000; TOME et al., 2001; GROSSMANN et al., 2002). Entretanto, devemos mencionar que os mecanismos pelos quais a melatonina desencadeia este processo são ainda pouco conhecidos (SAINZ et al., 2003). Estudos têm mostrado que um dos mecanismos de ação da melatonina na apoptose é a via intrínseca a qual é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, dentre outros. Em resposta a estes fatores, a mitocôndria sofre modificações de potencial e permeabilidade de membrana interna. Estas alterações mitocondriais podem ser cruciais para o disparo da morte, podendo facilitar a translocação de proteínas mitocondriais, bloqueio na síntese de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de contribuir para a ativação de caspases-9 e 3. O desarranjo mitocondrial também pode facilitar a liberação de citocromo C para o citoplasma, onde o mesmo forma complexo com o fator de ativação associado a apoptose-1 (APAF-1) e caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que é capaz de ativar a caspase-3 e provocar a apoptose (GRIVICICH et al., 2007; PARADIES et al., 2010).

As análises histopatológicas não revelaram metástase no fígado, intestino delgado e intestino grosso em nenhum dos animais dos grupos experimentais, entretanto este processo foi evidenciado nos pulmões e rins, sendo inibido pela administração da melatonina. Segundo Riabykh; Nikolaeva; Bodrova (2000), Lissoni (2003) e Neto; Scaldaferrì (2005), o efeito oncostático da melatonina foi reconhecido em diversos grupos de neoplasias pulmonares, das adrenais e de células renais. Esse efeito provavelmente está relacionado à capacidade da melatonina em reduzir a atividade mitótica (ARENDRT 2005; BARTSCH; BARTSCH 2006). Segundo Vanecek (1998) a capacidade que a melatonina possui em reduzir a atividade mitótica nas células tumorais



provavelmente está ligada aos receptores deste hormônio, nestas células, envolvendo, provavelmente, duas vias: uma de inibição da adenil-ciclase e outra de regulação do metabolismo de fosfolípidios e cálcio. Outra hipótese, para esta reação oncostática da melatonina, se relaciona à ação sobre resposta imunológica inespecífica. Receptores de melatonina já foram encontrados em linfócitos T-helper e monócitos. Através da ligação da melatonina aos T-helper, estimula a produção de interleucina-4, que aumenta a atividade de outras células da resposta imune, principalmente as células "Natural Killer" (MAESTRONI 1993; SRINIVASAN et al., 2005).

As dosagens utilizadas na presente pesquisa estão dentro de uma faixa intermediária em relação às preconizadas na literatura, porém bem acima da quantidade produzida pelo organismo, o que segundo Hevia et al. (2010) seria necessário para inibir o crescimento de diversos tipos de tumores. Este fato pode ter conduzido a uma ampliação da onda noturna de melatonina circulante nos animais, período em que a sensibilidade dos receptores para esse hormônio nas células TAE atingem níveis máximos (DILLON; EASLEY; ASCH 2002; BARTSCH; BARTSCH 2006), deixando-as vulneráveis a ação citotóxica da melatonina caracterizada pelas alterações ultraestruturais. Assim, podemos concluir que doses de 150 e 300µg por 30g de peso do animal de melatonina por 12 dias consecutivos têm uma atividade oncostática bastante efetiva sobre as células TAE.

Tabela 1: <sup>1</sup>Médias e desvio padrão da circunferência abdominal, volume do líquido ascítico, células TAE viáveis e tempo de vida dos camundongos dos grupos experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>Circunferência abdominal (cm)</b>	<b>Volume do líquido ascítico (mL)</b>	<b>Células TAE viáveis (x 10<sup>6</sup> cels./mL)</b>	<b>Tempo de vida dos animais (dias)</b>
I	9,96 ± 0,97 <sup>a</sup>	11,50 ± 1,87 <sup>a</sup>	67,00 ± 17,93 <sup>a</sup>	17,20 ± 1,64 <sup>a</sup>
II	10,1 ± 1,15 <sup>a</sup>	11,90 ± 2,24 <sup>a</sup>	67,87 ± 19,77 <sup>a</sup>	15,80 ± 1,92 <sup>a</sup>
III	9,92 ± 0,72 <sup>a</sup>	12,00 ± 1,58 <sup>a</sup>	66,18 ± 17,46 <sup>a</sup>	12,80 ± 1,48 <sup>a</sup>
IV	8,10 ± 0,61 <sup>b</sup>	5,80 ± 1,30 <sup>b</sup>	33,10 ± 15,91 <sup>b</sup>	24,00 ± 1,41 <sup>b</sup>
V	7,86 ± 0,18 <sup>b</sup>	5,70 ± 0,90 <sup>b</sup>	27,00 ± 11,54 <sup>b</sup>	25,40 ± 3,28 <sup>b</sup>
VI	7,66 ± 0,31 <sup>b</sup>	5,40 ± 2,07 <sup>b</sup>	23,70 ± 8,11 <sup>b</sup>	25,60 ± 2,07 <sup>b</sup>
VII	6,04 ± 0,96 <sup>c</sup>	4,60 ± 1,51 <sup>b</sup>	15,40 ± 4,53 <sup>b</sup>	24,60 ± 2,70 <sup>b</sup>
VIII	5,58 ± 0,90 <sup>c</sup>	4,50 ± 0,86 <sup>b</sup>	15,70 ± 4,10 <sup>b</sup>	25,20 ± 2,58 <sup>b</sup>
IX	5,46 ± 0,51 <sup>c</sup>	4,30 ± 1,15 <sup>b</sup>	13,90 ± 5,17 <sup>b</sup>	25,80 ± 1,30 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P>0,05). GI, GII e GIII- Animais dos grupos controle não pinealectomizados, sham-pinealectomizados e pinealectomizados respectivamente; GIV, GV e GVI- Animais tratados com melatonina com 150µg por 30g não pinealectomizados, sham-pinealectomizados e pinealectomizados respectivamente; GVII, GVIII e GIX- Animais tratados com melatonina com 300µg por 30g não pinealectomizados, sham-pinealectomizados e pinealectomizados respectivamente.

Tabela 2: <sup>1</sup>Médias e desvio padrão do tempo de sobrevivência (MST), porcentagem do aumento de sobrevivência (ILS) e do percentual do tempo de sobrevivência (TC) dos camundongos dos grupos experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>MST (dias)</b>	<b>ILS (%)</b>	<b>T/C (%)</b>
I	12,50 ± 2,12 <sup>a</sup>	-	-
II	14,50 ± 6,36 <sup>a</sup>	-	-
III	15,50 ± 0,70 <sup>a</sup>	-	-
IV	27,50 ± 3,53 <sup>b</sup>	120,00	220
V	28,00 ± 2,82 <sup>b</sup>	93,10	193
VI	29,50 ± 2,12 <sup>b</sup>	90,32	190
VII	29,00 ± 2,28 <sup>b</sup>	132,00	232
VIII	28,50 ± 1,41 <sup>b</sup>	96,55	197
IX	29,00 ± 1,14 <sup>b</sup>	87,09	187

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey-Kramer (P>0,05). GI, GII e GIII- Animais dos grupos controle não pinealectomizados, sham-pinealectomizados e pinealectomizados respectivamente; GIV, GV e GVI- Animais tratados com melatonina com 150µg por 30g não pinealectomizados, sham-pinealectomizados e pinealectomizados respectivamente; GVII, GVIII e GIX- Animais tratados com melatonina com 300µg por 30g não pinealectomizados, sham-pinealectomizados e pinealectomizados respectivamente.

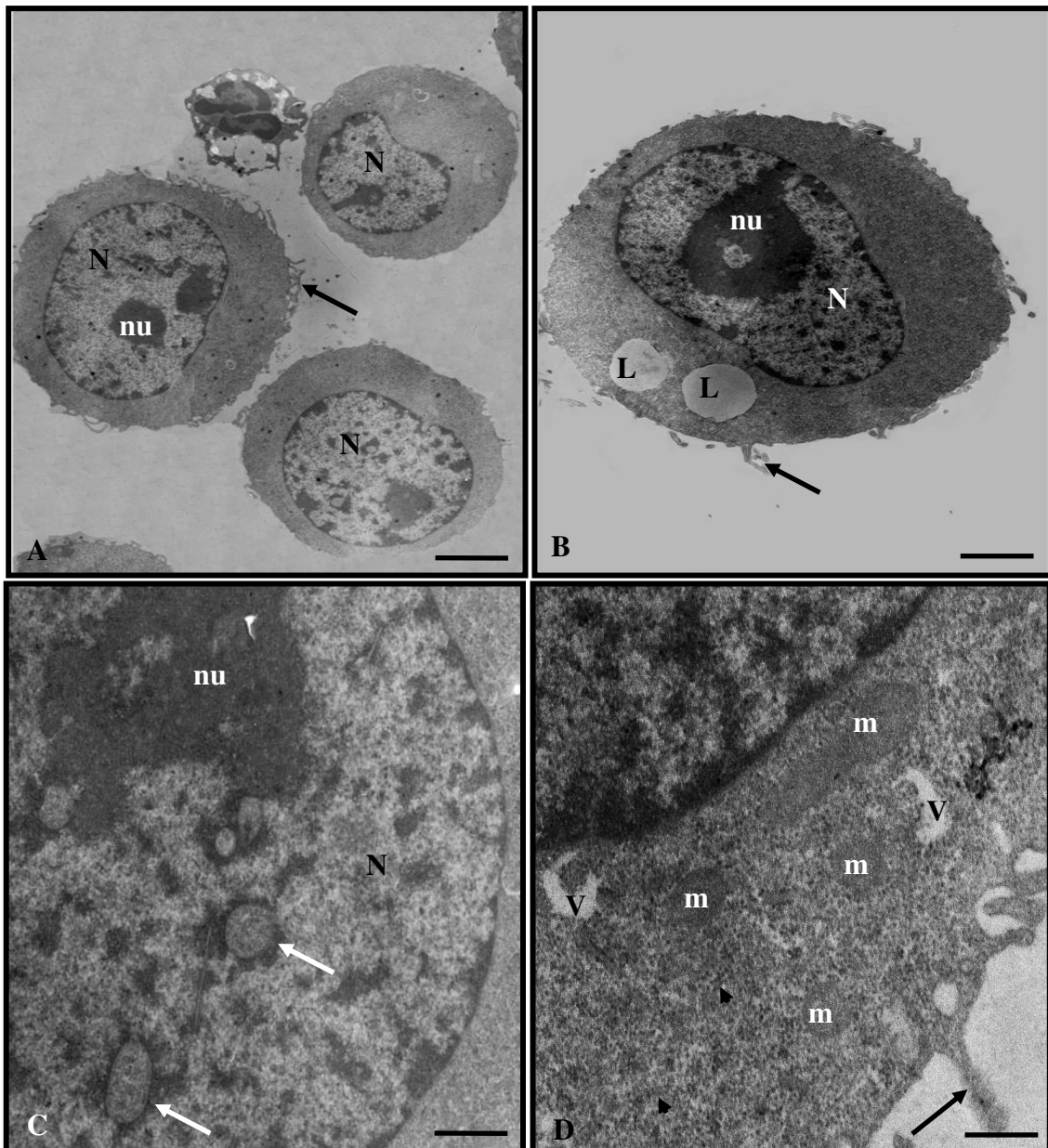


Figura 1: Eletromicrografia das células tumorais de Ehrlich dos grupos controle. A e B - Aspecto geral da célula tumoral (GI e GIII, respectivamente), Barras = 1 $\mu$ m. C - Detalhe do núcleo (GII) Barra = 1 $\mu$ m. D - Detalhe do citoplasma (GI), Barra = 1 $\mu$ m. N - núcleo, nu - nucléolo, seta preta - projeções filiformes, seta branca - vesículas nucleares elétron luscentes, m - mitocôndrias, L - gotículas de lipídios, V - vesículas citoplasmáticas, ponta de seta - ribossomos livres.

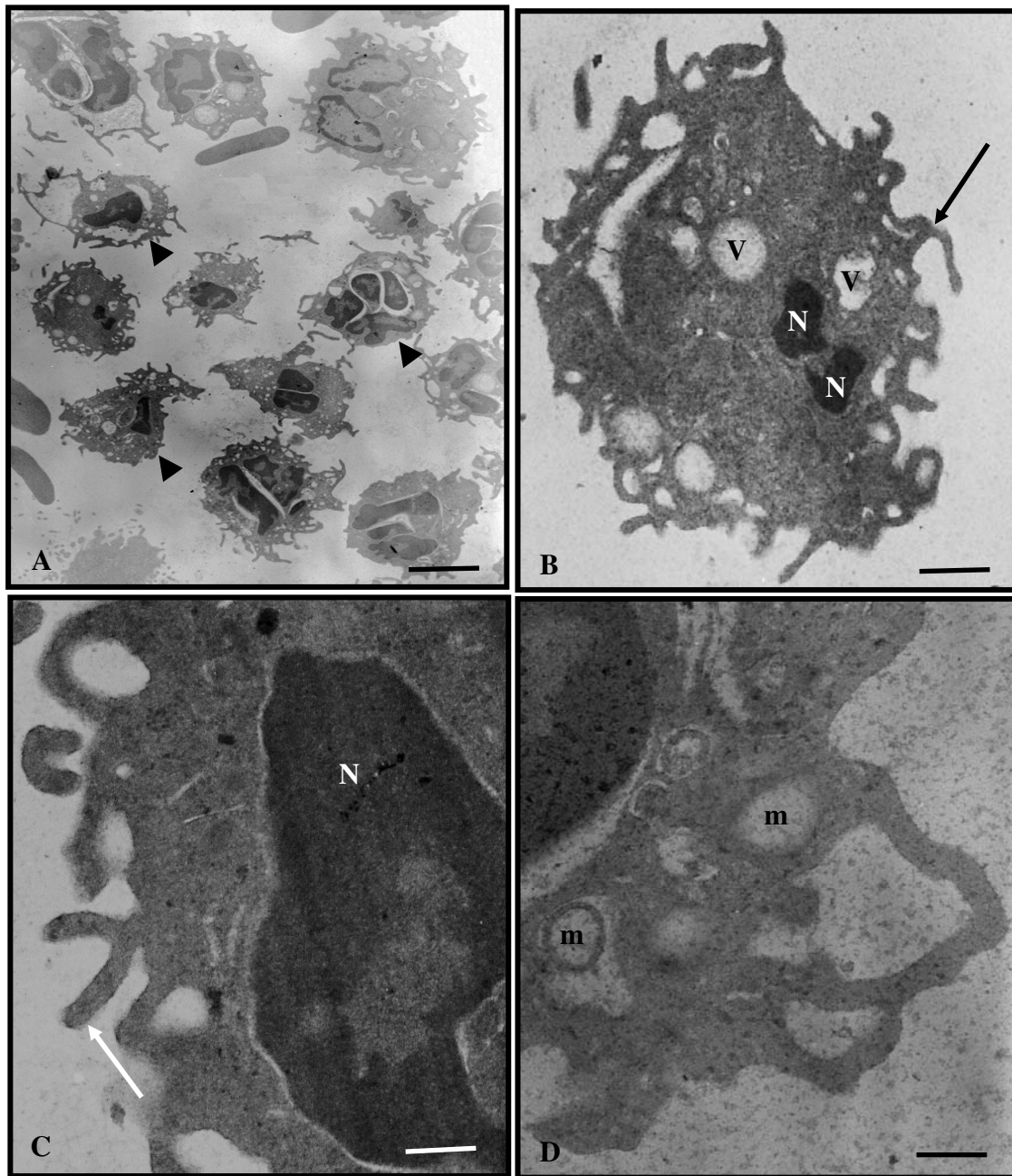


Figura 2: Eletromicrografia das células tumorais de Ehrlich dos grupos tratados com melatonina. A e B - Aspecto geral da célula tumoral com morfologia alterada e núcleo fragmentado (GIV e GVI, respectivamente), Barras = 1 $\mu$ m. C - Detalhe da superfície celular (GVII) Barra = 1 $\mu$ m. D - Detalhe do citoplasma mostrando mitocôndrias em degeneração (GIX), Barra = 1 $\mu$ m. Pontas de setas – células tumorais; N - núcleo, seta preta – projeções filiformes, seta branca – projeções bifurcadas, m – mitocôndrias, V – vacúolos citoplasmáticos.

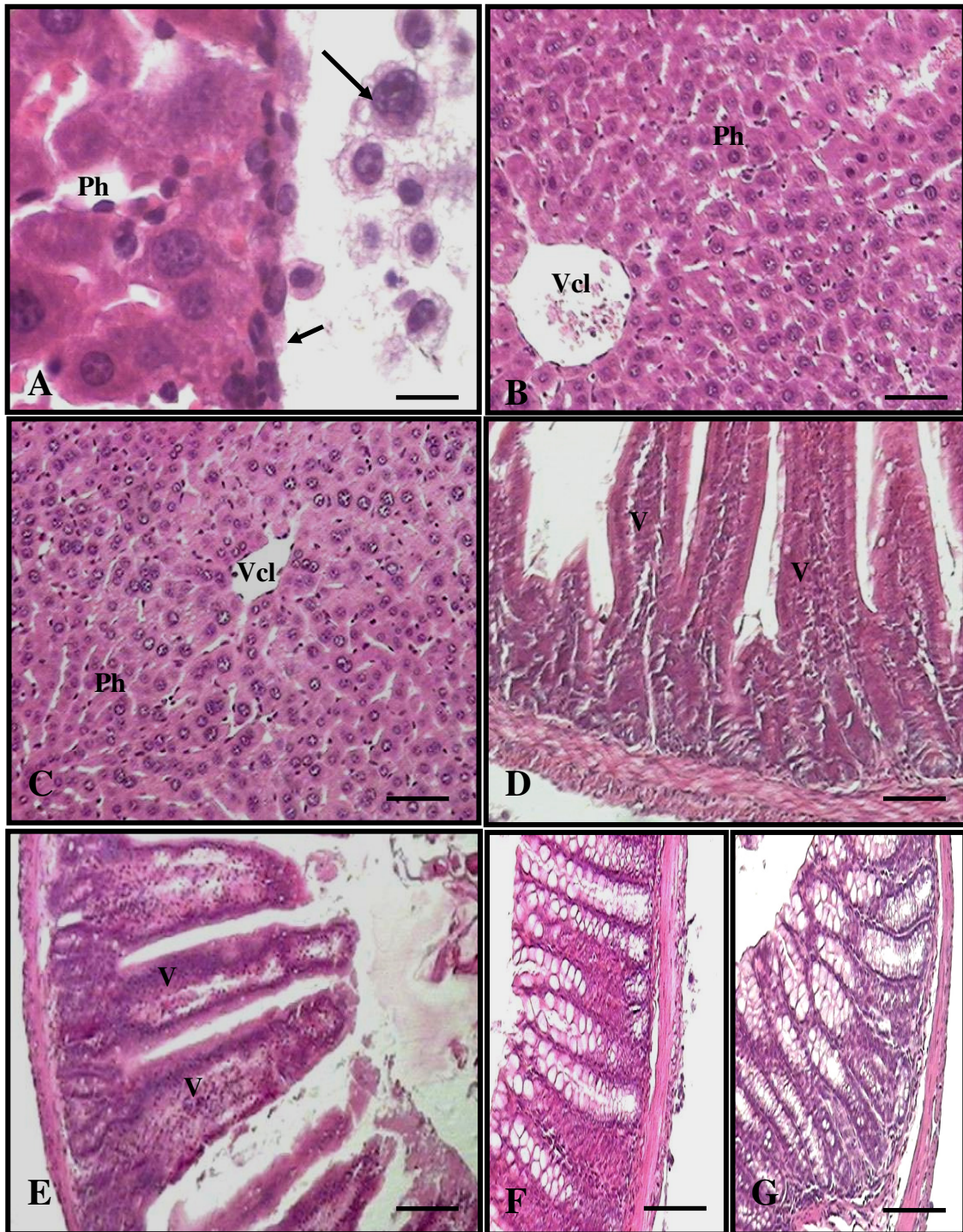


Figura 4: Fotomicrografias do fígado, intestino delgado e intestino grosso. A – Fígado de camundongo do grupo I, mostrando células tumorais aderidas na cápsula. H.E. Barra = 25 $\mu$ m. B - Fígado de camundongo do grupo II, mostrando parênquima hepático sem metástase. H.E. Barra = 25 $\mu$ m. C – Fígado de camundongo do grupo IV, sem metástase. H.E. Barra = 25 $\mu$ m. D e E - Detalhe do intestino delgado de camundongos dos grupos I e VI, respectivamente, sem metástase. H.E. Barras = 100 $\mu$ m. F e G – Intestino grosso de camundongos dos grupos III e IX, sem metástase. H.E. Barras = 100 $\mu$ m. Seta – células tumorais, Ph – parênquima hepático, Vcl – veia centro lobular, Seta curta – cápsula, V – vilosidades intestinais.

## 5. Referências

ALTUN, S. Normal, rejeneratif ve tümöral büyü-meler arasındaki kinetik ilişkiler. [Kinetic relationships among normal, tumoral and regenerative growths.] **Tr. J. Biology** v. 20, p. 153-173, 1996.

ARENDET, J. Melatonin: Characteristics, concerns, and prospects. **J. Biol. Rhythms**. V. 20, p. 291-303, 2005.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. **J. Neural. Transm.** v. 52, p. 269-279, 1981.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; JAIN, A.K.; LAUMAS, K.R.; WETTERBERG, L. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. **J. Neural. Transm.** v. 52, n. 4, p. 281-94, 2000.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; BLASK, D.E.; CARDINALI, D.P.; HRUSHESKY, W.J.M.; MECKE, D. **The pineal Gland and Cancer: Neuroimmunoendocrine Mechanisms in Malignancy**. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. p. 309–342, 2001.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H. The anti-tumor activity of pineal melatonin and cancer enhancing life styles in industrialized societies. **Cancer Cause Control**. v. 17, p. 559–571, 2006.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, JR.; ABREU, P.; LARDONE, P.J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; CHOI, W.S.; CHO, G.J.; WON, C.K.; KOH, P.O. Expression of melatonin growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy. **J. Vet. Science**. v. 6, p. 179-183, 2005.

[CATRINA, S.B.](#); [CATRINA, A.I.](#); [SIRZÉN, F.](#); [GRIFFITHS, W.](#); [BERGMAN, T.](#); [BIBERFELD, P.](#); [COCULESCU, M.](#); [MUTT, V.](#) A cytotoxic, apoptotic, low-molecular weight factor from pineal gland. **Life Sci.** v. 65: p.1047–1057, 1999.

CATRINA, S.B.; CURCA E.; CATRINA, A.I.; RADU, C.; COCULESCO, M. Melatonin shortens the survival rate of ehrlich ascites-inoculated mice. **Neuroendocrinol. Lett.** v. 22, p. 432-434, 2001.

DAGLI, M.L.Z; LORIS, S.C.S.; GUERRA, J.L. Effect of  $\beta$ -carotene on development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Sci.** v. 71, p. 717-724, 2002.

DAIR, E. L.; SIMÕES, R.S.; SIMÕES, M.J.; ROMEU, L.R.G.; 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. 1299-1305, 2008.

DILLON, D.C.; EASLEY, S.E.; ASCH, B.B. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 118, p. 451–458, 2002.

[DIMA, V.F.](#); [VASILIU, V.](#); [IONESCU, M.D.](#); [LAKY, D.](#); [ULMEANU, M.](#); [DIMA, S.V.](#) Ultrastructure of ehrlich ascites tumor cells sensitized with photofrin and irradiated with He-Ne laser *in vivo*. **Hirosaki Med. J.** v. 52, n. 1, p. 17-24, 2000.

EL-MISSIRY, M.A.; EL-AZIZ, A.F.A. Influence of melatonin on proliferation and antioxidant system in Ehrlich ascites carcinoma cells. **Cancer Letters.** v. 151, n. 2, p. 119-125, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.** v.53, p.335-43, 2007.



GROSSMANN, J.; WALTHER, K. ARTINGER M, RÜMMELE P, WOENCKHAUS M, SCHÖLMERICH J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. **Am. J. Gastroenterol.** v. 97, p. 1421-1428, 2002.

GUPTA, M., MAZUMDER, U.K., KUMAR, R.S., SIVAKUMAR, T., VAMSI, M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in swiss mice. **J. Pharmacol. Sci.** v. 94, p. 177-184, 2004.

HAUSBERGER, R.; DE BEM, R.S.; ALENCAR, B.L.; PEDRO SO, M.L.A.; BOARETTI, A.C.; MESSIAS-REASON, L.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. **J. Bras. Patol.** v.37, n.3, p. 187- 196, 2001.

HEVIA, D.; MAYO, J.; QUIROS, I.; GOMEZ-CORDOVES, C.; SAINZ, R. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 397, p. 1235-1244, 2010.

KAUR, C.; SIVAKUMAR, V.; LU, J.; TANG, F.R.; LING, E.A. Melatonin attenuates hypoxia-induced ultrastructural changes and increased vascular permeability in the developing hippocampus. **Brain Pathol.** v. 18, n. 4, p. 533-547, 2008.

KUSZAK, J.; RODIN, M. A new technique of pinealectomy for adult rats. **Experientia.** v. 33, p. 283-284, 1977.

LI, J.C.; XU, F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. **Neurosignals.** v. 6, p. 77-89, 1997.

LISSONI, P.; CHILELLI, M.; VILLA, S.; CERIZZA, L.; TANCINI, G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. **J. Pineal Res.** v. 35, n. 1, p. 5-12, 2003.

LOTUFO, C.M.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M.L.; FARSKY, S.H.; MARKUS, R.P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.** v. 430, p. 351–357, 2001.

LOTUFO, C.M.; YAMASHITA, C.E.; FARSKY, S.H.; MARKUS, R.P. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. **Eur. J. Pharmacol.** v. 534, p. 258–263, 2006.

MAESTRONI, G.J. The immunoneuroendocrine role of melatonin. **J. Pineal Res.** v. 14, n. 1, p. 1-10, 1993.

MARTINS, E.Jr. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in walker-256 tumour-bearing rats. **J. Neuroimmunol.** v. 82, p. 81-89, 2009.

MBAREK, L.A; MOUSE, H.A.; ELABBADI, M.; GAMOUH, A.; ABOUFATIMA, R.; BENHARRREF, A.; CHAIT, A.; KAMAL, M.; DALAL, A.; ZYAD, A. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 40, p. 839-847, 2007.

NETO, S.A.; SCALDAFERRI, M.P. Câncer e Melatonina - Revisão da literatura. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 51, p. 49-58, 2005.

OHTA, Y.; KONGO, M.; KISHIKAWA, T. Therapeutic effect of melatonin on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 527, p. 559-565, 2003.

OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; REITER, R.J.; ENZAN, H.; MIYAHARA, Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. **Eur. J. Pharmacol.** v. 469, n. 1-3, p. 145-152, 2003.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic effect of polyphenolic component of water soluble derivate of propolis against Ehrlich ascites tumor. **Biol. Pharm. Bull.** v. 28, n. 4, p. 694-700, 2005.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PARADIES, V.; REITER, R.J.; RUGGIERO, F.M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **J. Pineal Res.** v. 48, p. 297-310, 2010.

PRASAD, S.B.; GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. **Ind. J. Expt. Biol.** v. 32, p. 155-162, 1994.

RIABYKH, T.P.; NIKOLAEVA, T.G.; BODROVA, N.B. Effects of biorhythm regulator melatonin on DNA synthesis in short-term cultures of human malignant tumors. **Vestn Ross Akad Med Nauk.** v. 8, p. 3-30, 2000.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R.G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental *in vitro*. **Acta Cir. Bras.** v. 19, n. 1, p. 54-58, 2004.

SAINZ, M.R.; MAYO, C.J.; RODRIGUEZ, C.; TAN, X.D.; LOPEZ, B.S.; REITER, J.R. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cell Mol. Life Sci.** v. 60, p. 1407-1426, 2003.

SAUER, L.A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D.E. Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288CTCbearing and normal Buffalo rats via receptor-mediated signal transduction. **Life Sci.** v. 68, p. 2835-2844, 2001.

SCHERNHAMMER, E.; SCHULMEISTER, K. Light at night and cancer risk. **Photochem. Photobiol.** v. 4, p. 316-320, 2004.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; PERRUZZI, C.A.; HARVEY, V.S.; DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science.** v. 219, p. 983-985, 1983.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D.E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 97, p. 14376-14381, 2000.

SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I.; PANDI PERUMAL, S.R.; MILLER, S.C. Melatonin, immune function and aging **Immun. Ageing.** v. 2, p. 17-27, 2005.

TOME, M.E.; BAKER, A.F.; POWIS, G.; PAYNE, C.M.; BRIEHL, M.M. Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth. **Cancer Res.** v. 61, p. 2766-2773, 2001.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol Rev.** v. 78, p. 687-721, 1998.

VENU GOPAL, Y.; RAVINDRANATH, A.; KALPANA G; RAJU, A.B.; PRABHAKAR REDDDY, V. Antitumor activity of *Diospyros peregrina* on ehrlich ascites carcinoma in mice. **J. Sci. Res.** v. 3, n. 2, p. 413-419, 2011.

VIJAYALAXMI, Ph. D.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; HERMAN, T.S; THOMAS, C.R. J.R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** v. 3, p. 639-645, 2004.

### CAPÍTULO III

Efeito da melatonina sobre citotoxicidade e a ultraestrutura das células Caco-2 *in vitro*

Batista, A.P.C.<sup>1</sup>; Silva, T.G<sup>2</sup>; Teixeira, A.A.C<sup>3</sup>; Medeiros, P.L.<sup>4</sup>; Wanderley-Teixeira, V.<sup>3</sup>; Alves, L.C.<sup>5</sup>; Brayner, F.A.<sup>5</sup>; Silva, E.C<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Doutoranda da pós graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. E-mail: paula\_castor@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: teresinha100@gmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. E-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br, alvaro@dmfa.ufrpe.br

<sup>4</sup> Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: pmedlys@gmail.com, elicavalcanti@gmail.com

<sup>5</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ – PE – Brasil. E-mail: [lcalves@cpqam.fiocruz.br](mailto:lcalves@cpqam.fiocruz.br), [brayner@cpqam.fiocruz.br](mailto:brayner@cpqam.fiocruz.br)

Autor para correspondência

Professor Doutor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

## Resumo

O adenocarcinoma de colón intestinal, é uma das doenças em expansão no mundo, e no Brasil o câncer do cólon e reto, encontra-se entre os dez primeiros tipos mais incidentes. Estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado a eficácia do hormônio melatonina na prevenção e redução do crescimento tumoral. No entanto, são poucos os estudos com relação à ação da melatonina sobre as células caco-2. Assim, analisaram-se os efeitos da melatonina na ultraestrutura das células caco-2. Para avaliar a citotoxicidade utilizou-se o método colorimétrico MTT.  $2 \times 10^6$  cels/mL foram semeadas em microplacas e incubadas nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,0  $\mu\text{g/mL}$  de melatonina. Para análise ultra-estrutural utilizou-se concentrações que apresentaram baixa (50  $\mu\text{g/mL}$ ), média (1,56  $\mu\text{g/mL}$ ) e alta (0,78  $\mu\text{g/mL}$ ) citotoxicidade mais o controle. Ultra-estruturalmente as células tumorais do controle mostraram-se preservadas formando monocamada. Nos tratamentos com melatonina não foi evidenciada monocamadas. Na concentração que apresentou baixa toxicidade as células caco2 apresentaram alterações morfológicas, com numerosos vacúolos, degeneração mitocondrial e redução de glicogênio. No entanto, nos tratamentos que mostraram média e alta citotoxicidade as células caco2 apresentaram-se também com morfologia alterada, porém com características de células em degeneração pela presença de numerosos vacúolos, ausência de microvilosidades e grânulos de glicogênio, redução significativa de ribossomos, degeneração mitocondrial, vacúolos, às vezes contendo substância elétron-lucente, além de fragmentação nuclear. Assim, podemos inferir que doses de 1,56 e 0,78  $\mu\text{g/mL}$  de melatonina promove citotoxicidade nas células caco2, o que provavelmente pode estar relacionado com a geração de ROS.

Palavras-chave: Pineal, carcinoma, morfologia, toxicidade, cultivo celular

## 1. Introdução

O adenocarcinoma de colon intestinal (caco-2) é uma das doenças em maior expansão no mundo (KONISHI et al., 2010; KANNEN et al., 2011a,b). Em 2009 foram relatados 106.100 novos casos nos EUA (KONISHI et al., 2010). A incidência do câncer de cólon no período de 1992 a 2007 levou a 842 mortes em uma população de 2.278 homens e mulheres diagnosticados com câncer colorretal não metastático, o que correspondeu a aproximadamente 37% de óbitos entre os pacientes avaliados (DEHAL et al., 2012).

No Brasil, com o aumento da expectativa de vida da população, as neoplasias vêm ganhando cada vez mais importância no perfil de morbidade e mortalidade, configurando-se como um problema de saúde pública. Neste contexto, o câncer do cólon e reto, encontra-se entre os dez primeiros tipos de câncer mais incidentes no Brasil, tanto no sexo masculino como no feminino (INCA, 2012).

As células caco-2, no seu estado de diferenciação completa, apresentam fenótipo enterocítico. Após cerca de cinco dias de cultura elas formam monocamadas e apresentam microvilosidades, enzimas, receptores e transportadores característicos do epitélio intestinal, constituindo um bom modelo para estudos de transporte intestinal (GONÇALVES et al., 2008).

O tratamento das células caco-2 consiste de procedimento cirúrgico, quimioterapia e radioterapia, sendo as duas últimas terapias associadas à cirurgia. A ressecção cirúrgica do local afetado e a realização de uma colostomia permanente constituem-se na mais efetiva terapia para o câncer de colon (INCA, 2003), porém bastante invasiva e com fortes efeitos colaterais.

A melatonina, N-acetil-5-methoxi-triptamina, é uma molécula pequena lipofílica secretada essencialmente pela glândula pineal e sua síntese mostra um padrão circadiano (MACCHI; BRUCE, 2004; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). A literatura relata que esse hormônio inibe a proliferação de células tumorais por diferentes mecanismos. No caso de hepatomas e câncer pulmonar a melatonina atua nos receptores específicos de membrana, na carioteca e limitando o transporte de ácido linoléico (fator de crescimento tumoral) (BLASK et al., 2002). Sabe-se ainda que a melatonina é um potente agente antioxidante que regula vários processos fisiológico no fígado além de inibir o crescimento de hepatocarcinomas (BLASK; DAUCHY; SAUER, 2004).

Estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, da eficácia de concentrações fisiológicas e administração exógena do hormônio melatonina têm mostrado excelentes resultados na prevenção e na redução do crescimento tumoral, apesar da maioria dos trabalhos resultarem da experimentação animal (SAUER; DAUCHY; BLASK, 2001; BLASK et al., 2002; MEDEIROS et al., 2003). Estudos em humanos (LISSONI et al., 2003) com uma variedade de diferentes cânceres também sugerem uma ação oncostática da melatonina (REITER et al., 2003; BARTSCH; BARTSCH, 2006; JUNG; AHMAD, 2006). No entanto, são ainda poucos os estudos com relação à ação da melatonina sobre as células caco-2; o que faz despertar o interesse sobre o efeito antitumoral (sem efeitos colaterais tão agressivos ou menos severo) desse hormônio e suas repercussões sobre a referida linhagem. Assim, a presente pesquisa analisou os efeitos da melatonina exógena na ultraestrutura das células caco-2 *in vitro*.



## **2. Materiais e Métodos**

**O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de Ética institucional de nº. 012/2012**

### *2.1. Local de realização dos experimentos*

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco.

### *2.2. Cultivo celular*

As células da linhagem colônica do adenocarcinoma humano (caco-2) foram obtidas via compra direta do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para o estudo *in vitro*. Para a manutenção das células foi utilizado o meio de cultura DMEM (Sigma), suplementado com 1% (v/v) de soro fetal bovino (GIBCO), 1% (p/v) de glutamina 2,0 mM (Sigma) e 1% (p/v) de uma solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/ml).

### *2.3. Melatonina*

A melatonina foi proveniente da Sigma, St. Louis, MO, USA, a qual foi dissolvida em etanol e diluída em solução salina 0,9% (NaCl a 0,9%) para obtenção das concentrações utilizadas no experimento (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e 0,78 $\mu$ g/mL).

### *2.4. Atividade citotóxica da melatonina sobre as células Caco 2*

Para avaliar a citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazolium – SIGMA] que baseia-se na conversão do sal

tetrazólio para o produto colorido formazan, cuja concentração pode ser determinada espectrofotometricamente, as células foram semeadas ( $2 \times 10^6$  cels/mL) com meio DMEM em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa úmida, com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24h, o meio de cultura foi retirado, e as células foram incubadas com diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e  $0,78\mu\text{g/mL}$ ) do hormônio melatonina a 0,5% de etanol (em quadruplicatas). Também foram adicionados meio DMEM contendo etanol a 0,1% (controle positivo) e meio contendo DMEM puro (controle negativo). Após 72h de incubação com a melatonina, as soluções dos poços foram retiradas por aspiração e foram adicionados  $25\ \mu\text{L}$  da solução MTT ( $5\ \text{mg/mL}$ ). Após 3h de incubação a  $37^\circ\text{C}$  a solução de MTT foi aspirada e foram adicionados  $100\ \mu\text{L}$  de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Após a solubilização foram determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade relativa das células ao grupo controle negativo (MOSMAN, 1983). Para os testes de citotoxicidade das células caco-2 sob ação do hormônio melatonina, foram utilizadas preparações celulares cuja viabilidade se encontrava acima de 95%. Baseando-se nas análises citotóxicas foram utilizadas as concentrações de melatonina que apresentaram baixa, média e alta citotoxicidade, mais o controle. Os dados da leitura foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, e as médias comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

### *2.5. Microscopia eletrônica de transmissão MET*

As células foram tripsinizadas e plaqueadas ( $1\ \text{mL}$  de cultura DMEM), por 24h na concentração de  $1 \times 10^5$ . Após a formação de uma monocamada as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril, sendo adicionado em cada poço  $1\ \text{mL}$  de melatonina nas

concentrações que apresentaram alta, média, baixa citotoxicidade e o controle. A placa de MET foi tripsinizada e as células foram soltas, centrifugadas e lavadas por duas vezes com PBS. Após centrifugação os pellets foram ressuspensos em fixador, etiquetados e guardados sob refrigeração. Posteriormente as amostras de células (pellets) foram lavadas em PBS pH 7,2, fixadas em 2% glutaraldeído e 4% Paraformaldeído, em tampão PHEM pH 7,2. Após uma hora, o material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM, durante 60 minutos à temperatura ambiente no escuro. As células foram então lavadas no mesmo tampão e desidratadas em acetona (série crescente) e incluídas em resina Epoxi. Cortes ultrafinos foram obtidos e coletados em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila 5% por 40 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. A observação foi feita em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900.

### **3. Resultados**

A citotoxicidade foi inversamente proporcional às concentrações de melatonina, sendo a concentração 0,78 µg/mL a que causou maior toxicidade nas células caco-2, seguida da concentração 1,56 µg/mL de melatonina. A concentração de 50 µg/mL de melatonina apresentou a menor citotoxicidade não diferindo das demais concentrações e do controle (Fig. 1).

O aspecto ultra-estrutural das células tumorais do grupo controle mostrou células bem preservadas formando monocamada. Nessas células foi possível evidenciar a presença de microvilosidades, núcleo volumoso com áreas eucromáticas e heterocromáticas, citoplasma bem organizado com numerosos ribossomos, mitocôndrias

na região apical, alguns vacúolos e grande reserva de grânulos de glicogênio (Figs. 2A, 2B, 2C e 2D).

Nos grupos tratados com melatonina não foi evidenciado a formação de monocamadas. No grupo em que as células caco2 apresentaram menor citotoxicidade (50 µg/mL de melatonina) foi visualizado alteração na morfologia celular, presença de microvilosidades, núcleo volumoso com áreas heterocromáticas periféricas, citoplasma com numerosos vacúolos, degeneração mitocondrial, ribossomos abundantes e redução das reservas de glicogênio (Figs. 3A, 3B, 3C e 3D). No entanto, nos tratamentos que mostraram média e alta citotoxicidade (1,56 e 0,78 µg/mL de melatonina, respectivamente), as células caco2 apresentaram-se também com morfologia alterada, porém com características de células em degeneração pela presença de numerosos vacúolos e ausência de microvilosidades. Foi observado ainda ausência de glicogênio, redução significativa de ribossomos, degeneração mitocondrial, vacúolos, às vezes contendo substância elétron-lucente, além de fragmentação nuclear (Figs. 4A, 4B, 4C e 4D).

#### **4. Discussão**

A avaliação da citotoxicidade de um fármaco é importante para a indústria farmacêutica, estabelecer a eficiência e segurança para administração da droga. Neste contexto, as células da linhagem caco-2 são utilizadas como modelo, no desenvolvimento de drogas cuja administração é a via oral, devido ao seu fenótipo característico de enterócito (LEONARD et al., 2000; RODRIGUEZ-JUAN et al., 2001; MIRET; ABRAHAMSE; DE GROENE, 2004; ARTURSSON, PALM, LUTHMAN, 2012).

Em nossos experimentos, foi observado que a citotoxicidade nas células caco-2 foi inversamente proporcional às concentrações de melatonina, sendo as concentrações de 50 e 0,78µg/mL as que causaram menor e maior citotoxicidade, respectivamente. A ação da melatonina em processos neoplásicos é atribuída ao efeito anti-oxidante, muitas vezes dose dependente (COS; SANCHEZ-BARCELO, 2000; BARTSH et al., 2001). Estudos mostraram que doses de 2 mg/L de melatonina, administrada em roedores na água de beber, foi mais eficiente na inibição do crescimento de tumores mamário e pulmonar, quando comparada a dose de 20 mg/L (ANISIMOV et al., 2003; VESNUSHKIN et al., 2006). Por outro lado, a absorção da melatonina, em concentrações de 400 µg/mL, pelas células caco-2, demonstrou que não ocorreu dano na membrana plasmática ou diminuição da viabilidade das mesmas (HAFNER et al., 2009). Tal fato pode estar relacionado à capacidade da melatonina em promover a geração de espécies de oxigênio reativo intracelular (ROS), extremamente tóxico a alguns tipos de tumores apenas em baixas concentrações (BEJARANO et al., 2010).

Descobertas recentes indicam que os ROS são envolvidos na indução da apoptose em alguns tipos celulares (ALBERTINI et al., 2006; D'AGOSTINO; PUTNAM; DEAN, 2007; MORGADO et al., 2008; RADOGNA et al., 2009; BEJARANO et al., 2009; GONZALEZ et al., 2010). A análise ultraestrutural das células caco2 revelou alterações características de processo apoptótico, nos tratamentos que receberam 1,56 e 0,78µg/mL de melatonina, principalmente pela fragmentação nuclear e degeneração mitocondrial. Em células cancerígenas os ROS podem exercer um duplo efeito sobre o crescimento celular e apoptose. Assim, os ROS podem iniciar a transformação das células, conduzindo a mutações durante a replicação do DNA (GACKOWSKI et al., 2002), enquanto que nas células já alteradas, os ROS desempenham um importante papel na iniciação e execução de apoptose (WENZEL; NICKEL; DANIEL, 2005;

KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). O equilíbrio entre os ROS e os níveis de antioxidantes, portanto, determina criticamente a apoptose em células cancerosas, e ultrapassa o sistema de defesa antioxidante, acelerando a produção de ROS mitocondrial (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Segundo Zhang; Zhang; Zhang (2011) a melatonina, em concentrações micromolares, induz a geração de ROS mitocondrial, levando a ativação da caspase-9 e 3 e indução da morte celular (SHANKAR; SIDDIQUI; SRIVASTAVA, 2007). Dessa forma, podemos inferir que doses de 1,56 e 0,78 µg/mL de melatonina promove citotoxicidade nas células caco2, o que provavelmente pode estar relacionado com a geração de ROS.

## 5. Referências

- ALBERTINI, M.C.; RADOGNA, F.; ACCORSI, A.; UGUCCIONI, F.; PATERNOSTER, L.; CERELLA, C.; [DE NICOLA, M.](#); [D'ALESSIO, M.](#); [BERGAMASCHI, A.](#); [MAGRINI, A.](#); [GHIBELLI, L.](#) Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. **Ann. NY Acad. Sci.**, v 1091, p. 10-16, 2006.
- ANISIMOV, V.N.; ALIMOVA, I.N.; BATURIN, D.A.; POPOVICH, I.G.; ZABEZHINSKI, M.A.; ROSENFELD, S.V.; MANTON, K.G.; SEMENCHENKO, A.V.; YASHIN, A.I. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. **Exp. Gerontol.**, v. 38, n. 4, p. 449-461, 2003.
- ARTURSSON; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, p. 280-289, 2012.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H. The anti-tumor activity of pineal melatonin and cancer enhancing life styles in industrialized societies. **Cancer Cause Control**, v. 17, p. 559-571, 2006.

BARTSH, C.; BARTSH, H.; BLASK, D.E.; CARDINALI, D.P.; HRUSHESKY, W.J.M.; MECKE, D. **The pineal gland and cancer. Neuroimmunoendocrine mechanisms in malignancy.** 1 edition, Berlim, Springer, 578p., 2001.

BEJARANO, I.; ESPINO, J.; BARRIGA, C.; REITER, R.J.; PARIENTE, J.A.; RODRÍGUEZ, A.B. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: Relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 108, p. 14-20, 2010.

BEJARANO, I.; ESPINO, J.; GONZALEZ-FLORES, D.; CASADO, J.G.; REDONDO, P.C.; ROSADO, J.A.; BARRGIGA, C.; PARIENTE, J.A.; RODRIGUEZ, A.B. Role of calcium signals on hydrogen peroxide- induced apoptosis in human mieloide HL-60 cells. **Int. J. Biomed. Sci.**, v. 5, p. 246-256, 2009

BLASK, D.E.; DAUCHY, R.T.; SAUER, L.A. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. **Carcinogenesis**, v.25, n.6, p. 951-960, 2004.

BLASK, D.E.; PELLETEIR, D.B.; HILL, S.M.; LEMUS-WILSON, A.; GROSSO, D.S.; WILSON, S.T.; WISE, M.E. Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the NMU mammary model of carcinogenesis: potential involvement of mechanism in vivo. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 117, p. 526-532, 2002.

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

COS, S.; SANCHEZ-BARCELO, E.J. Melatonin and mammary pathological growth. **Front. Neuroendocrin.**, v. 17, p. 133-170, 2000.

D'AGOSTINO, D.P.; PUTNAM, R.W.; DEAN, J.B. Superoxide (\*O<sub>2</sub>) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. **J. Neurophysiol.**, v. 98, p. 1030-1041, 2007.

DE VOS, K.; GOOSSENS, V.; BOONE, E.; VERCAMMEN, D.; VANCOMPERNOLLE, K.; VANDENABEELE, P. The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. **J Biol Chem.**v. 27, p.9673-80,1998.

[DEHAL, A.N.](#); [NEWTON, C.C.](#); [JACOBS, E.J.](#); [PATEL, A.V.](#); [GAPSTUR, S.M.](#); [CAMPBELL, P.T.](#) Impact of diabetes mellitus and insulin use on survival after colorectal cancer diagnosis: the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. **[J. Clin. Oncol.](#)**, v. 30, n. 1, p. 53-59, 2012.

GACKOWSKI, D.; BANASZKIEWICZ, Z.; ROZALSKI, R.; JAWIEN, A.; OLINSKI, R. Persistent oxidative stress in colorectal carcinoma patients. **Int. J. Cancer**, v. 101, p. 395-397, 2002.

GONÇALVES, P.; ARAÚJO, J.R.; AZEVEDO, I.; MARTEL, F. Lack of significant effect of cannabinoids upon the uptake of 2-deoxy- D-glucose by Caco-2 cells. **Pharmacology**, v. 82, p. 30-37, 2008.

GONZOLEZ, D.; ESPINO, J.; BEJARANO, I.; RODRÍGUEZ, A.B.; PARIENTE, J.A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced caspase activation is dependent of calcium signal in HL-60 cells. **Curr. Signal Transduct. Ther.**, v. 5, p. 181-186, 2010.

HAFNER, A.; LOVRIC, J.; VOINOVICH, D.; GRCIC, J.F. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. **Int. J. Pharm.**, v. 381, n. 2, p. 205-213, 2009.



INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE.  
Estimativa 2003/ incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): 2003.  
Disponível em:

[http://www1.inca.gov.br/publicacoes/Falando\\_sobre\\_Cancer\\_de\\_Intestino.pdf](http://www1.inca.gov.br/publicacoes/Falando_sobre_Cancer_de_Intestino.pdf)

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE.  
Estimativa 2012/ incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): 2012.  
Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc\\_do\\_cancer\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf)

JUNG, B.; AHMAD, N. Melatonin in cancer management: progress and promise.  
**Cancer Res.**, v. 66 p. 9789-9793, 2006.

KANNEN, V.; MARINI, [T.](#); [TURATTI, A.](#); [CARVALHO, M.C.](#); [BRANDÃO, M.L.](#);  
[JABOR, V.A.](#); [BONATO, P.S.](#); [FERREIRA, F.R.](#); [ZANETTE, D.L.](#); [SILVA, W.A. JR.](#);  
[GARCIA, S.B.](#) Fluoxetine induces preventive and complex effects against colon cancer  
development in epithelial and stromal areas in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 204, n. 2-3, p.  
134-140, 2011a.

KANNEN, V.; MARINI, T.; ZANETTE, D.L.; [FRAJACOMO, F.T.](#); [SILVA, G.E.](#);  
[SILVA, W.A. JR.](#); [GARCIA, S.B.](#) The melatonin action on stromal stem cells within  
pericryptal area in colon cancer model under constant light. **Biochem Biophys Res  
Commun**, v. 405, n. 4, p. 593-598, 2011b.

KONISHI, K.; YAMAMOTO, H.; [MIMORI, K.](#); [TAKEMASA, I.](#); [MIZUSHIMA, T.](#);  
[IKEDA, M.](#); [SEKIMOTO, M.](#); [MATSUURA, N.](#); [TAKAO, T.](#); [DOKI, Y.](#); [MORI, M.](#)  
Expression of C4.4A at the invasive front is a novel prognostic marker for disease  
recurrence of colorectal cancer. **Cancer Sci.**, v. 101, n. 10, p. 2269-2277, 2010.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane  
permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.

LEONARD, M.; CREED, E.; BRAYDEN, D.; BAIRD, A.W. Evaluation of the Caco-2 monolayer as a model epithelium for iontophoretic transport. **Pharm. Res.**, v. 17, p. 1181-1188, 2000.

LISSONI, P.; CHILELLI, M.; VILLA, S.; CERIZZA, L.; TANCINI, G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. **J. Pineal Res.** v.35, p.12-15, 2003.

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

MEDEIROS, P. L.; VALENÇA, M. M., NASCIMENTO, S. C.; RODRIGUES, C. G.; CARNEIRO, C. M. M.; MARCHIORO, M.; BARBOSA, C. T. F.; Ação da melatonina sobre as correntes macroscópicas de células h.ep.-2. **Biol. Geral Exper**, v. 2, p. 9-17, 2003.

MIRET, S.; ABRAHAMSE, L.; DE GROENE, E.M. Comparison of in vitro models for the prediction of compound absorption across the human intestinal mucosa. **J. Biomol. Screen**, v. 9, p. 598-606, 2004.

MORGADO, S.; GRANADOS, M.P.; BEJARANO, I.; LOPEZ, J.J.; SALIDO, G.M.; GONZALEZ, A.; PARIENTE, J.A. Role of intracellular calcium on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial apoptosis in rat pancreatic acinar AR42J cells. **J. Appl. Biomed.**, v. 6, p. 215-228, 2008.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

RADOGNA, F.; PATERNOSTER, L.; DE NICOLA, M.; CERELLA, C.; AMMENDOLA, S.; BEDINI, A.; [TARZIA, G.](#); [AQUILANO, K.](#); [CIRIOLO, M.](#); [GHIBELLI, L.](#)

Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 293, p. 37-45, 2009.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; LEON, J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications. **Acta Biochim. Polon.**, v. 50, p.1129-1146, 2003.

RODRIGUEZ-JUAN, C.; PEREZ-BLAS, M.; VALERI, A.P.; AGUILERA, N.; ARNAIZ-VILLENA, A.; PACHECO-CASTRO, A.; MARTIN-VILLA, J.M. Cell surface phenotype and cytokine secretion in Caco-2 cell cultures: increased RANTES production and IL-2 transcription upon stimulation with IL-1[beta]. **Tissue Cell**, v. 33, p. 570–579, 2001

SAUER, L. A.; DAUCHY, R.T.; BLASK, D. E. Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288CTCbearing and normal Buffalo rats via receptor-mediated signal transduction. **Life Sci.**, v. 68, p. 2835-2844, 2001.

SHANKAR, S.; SIDDIQUI, I.; SRIVASTAVA, R.K. Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-*trans*-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgeninsensitive prostate cancer cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 304, p. 273-285, 2007.

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

VESNUSHKIN, G.M.; PLOTNIKOVA, N.A.; SEMENCHENKO, A.V.; ANISIMOV, V.N. [Melatonin inhibits urethane-induced carcinogenesis tumors in murine lung. **Vopr. Onkol.**, v. 52, n. 2, p. 164-168, 2006.

WENZEL, U.; NÍQUEL, U.M.; DANIEL, H. Melatonina potencializa flavona apoptose induzida em células de cancro do cólon humano através do aumento do nível de produtos finais glicolíticos. **Int J Cancer**.v.116, n.2, p.236-42, 2005.

ZHANG, H.M.; ZHANG, Y.; ZHANG, B.X. The role of mitochondrial complex III in melatonin-induced ROS production in cultured mesangial cells. [\*\*J. Pineal Res.\*\*](#), v. 50. n. 1, p. 78-82, 2011.

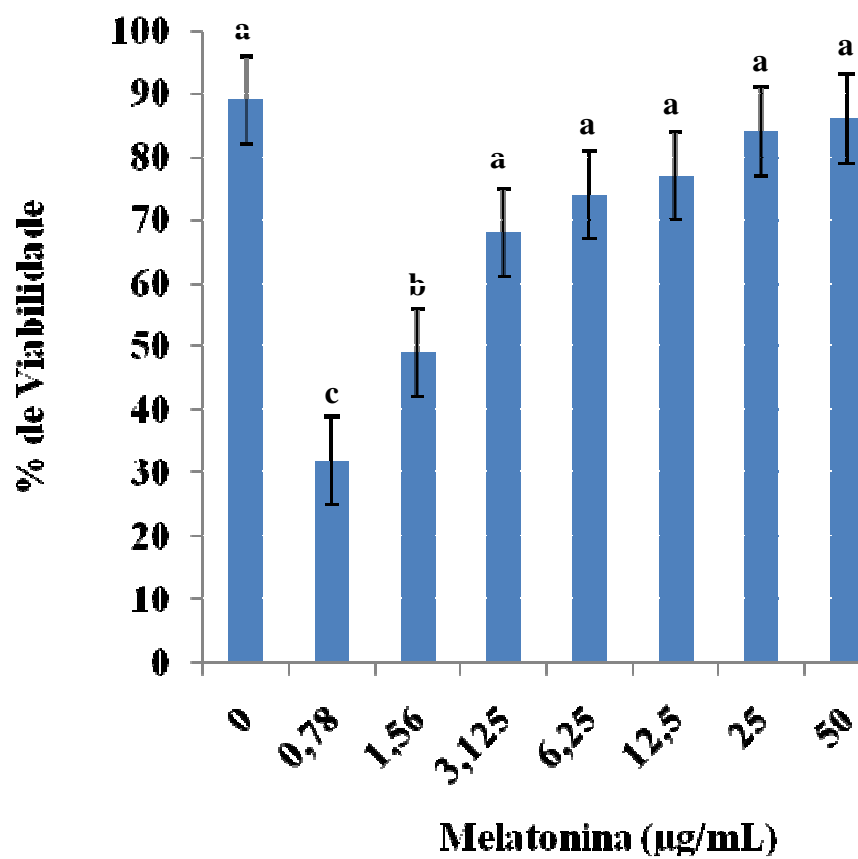


Figura 1: Percentual de viabilidade das células caco 2, após teste de citotoxicidade com melatonina. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

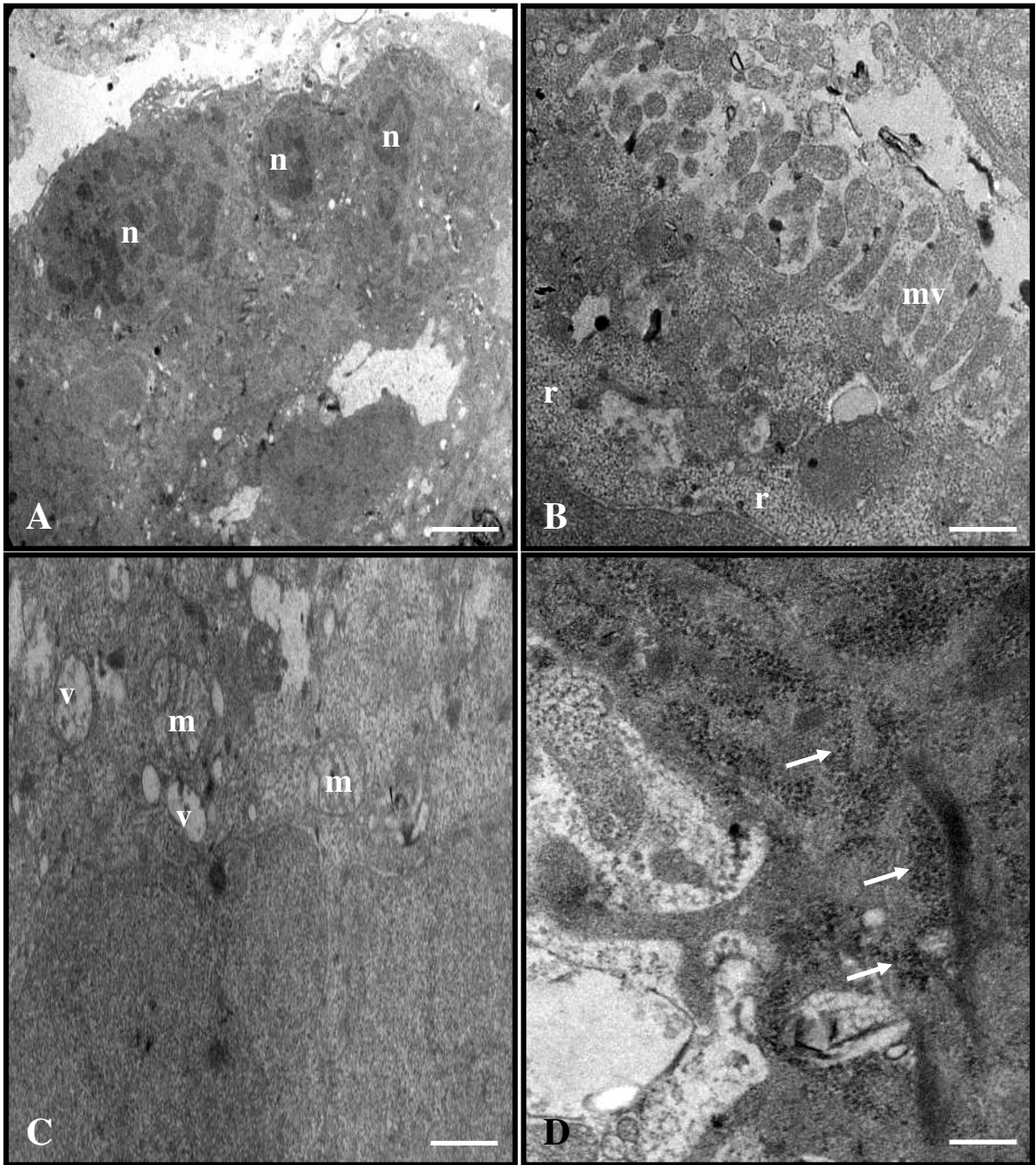


Figura 2. Eletromicrografias de transmissão das células Caco-2 (controle). (n) núcleo, (mv) microvilosidades, (r) ribossomos, (v) vacúolos, (m) mitocôndrias, (setas) glicogênio.

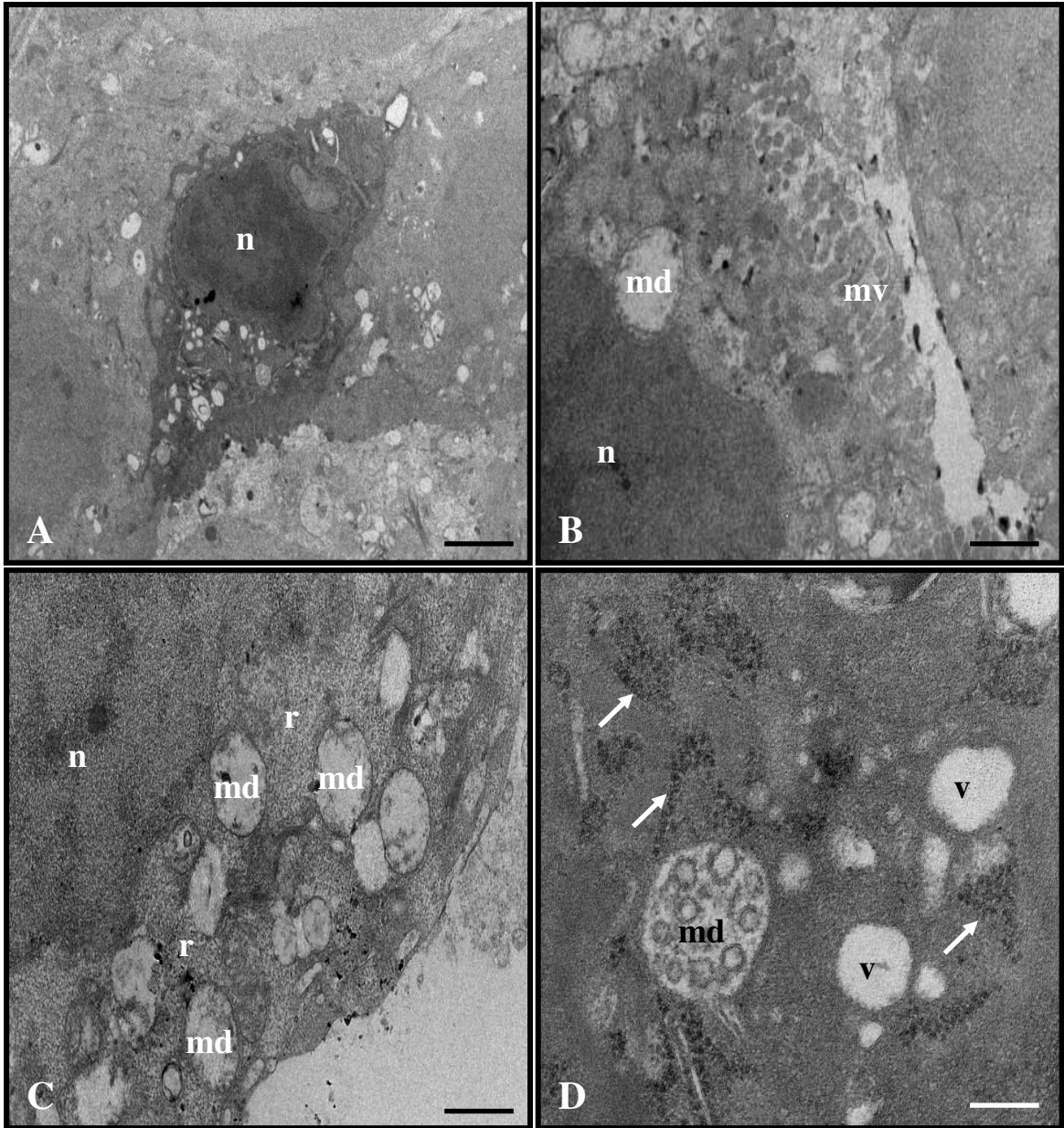


Figura 3. Eletromicrografias de transmissão das células Caco-2 tratadas com melatonina na concentração de 50µg/mL. (n) núcleo, (mv) microvilosidades, (v) vacúolos, (md) mitocôndrias degeneradas, (r) ribossomos, (setas) glicogênio.

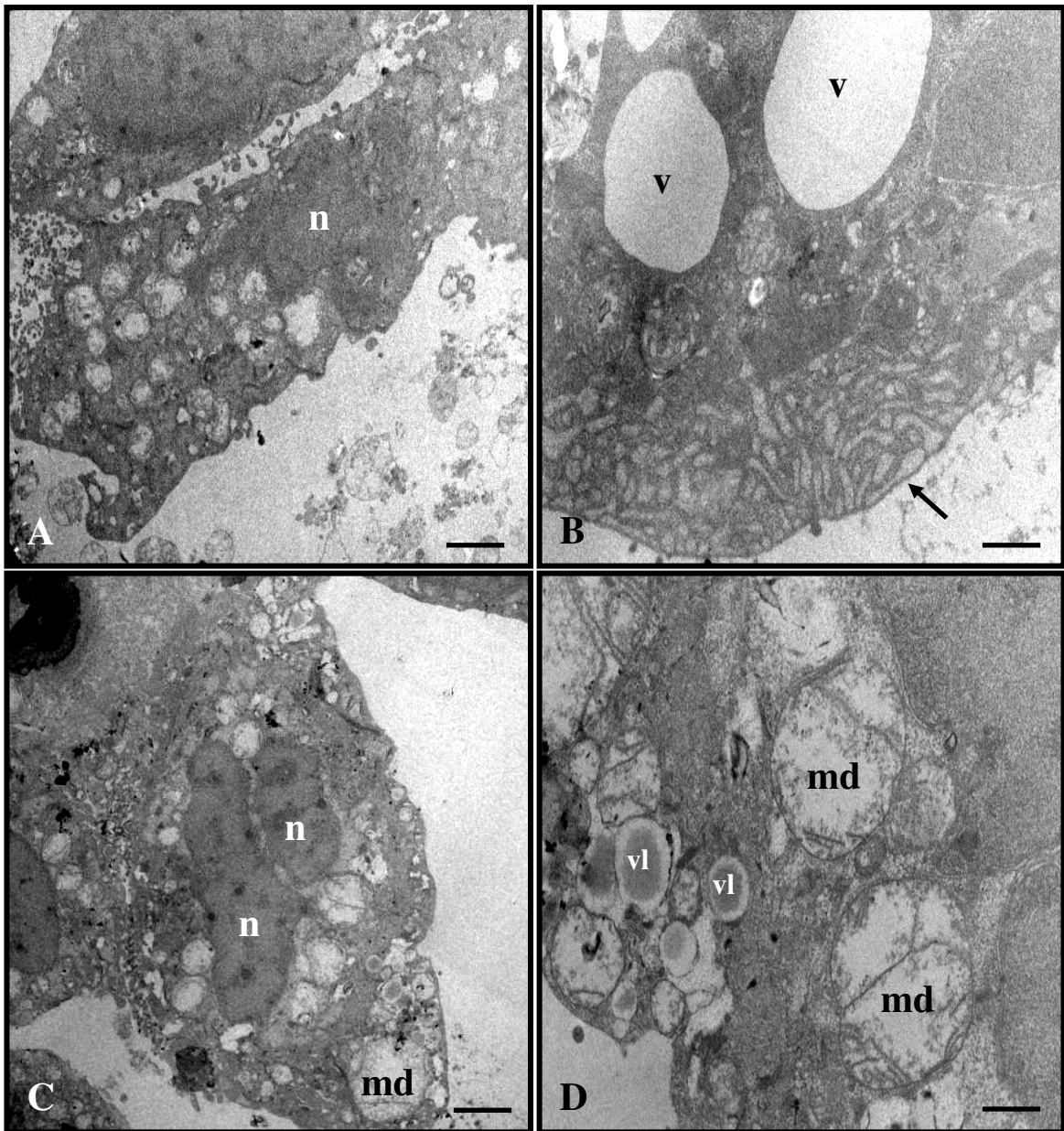


Figura 4. Eletromicrografias de transmissão das células Caco-2 tratadas com melatonina na concentração de 1,56  $\mu\text{g/mL}$  (A e B) e 0,78  $\mu\text{g/mL}$  (C e D). (n) núcleo, (v) vacúolos, (vl) vacúolos elétron-lucentes, (md) mitocôndrias degeneradas, (seta) superfície celular sem microvilosidades.