



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA MARIA BITENCOURT DE MORAIS VALENTIM

**ESTRESSE OXIDATIVO E INTEGRIDADE CELULAR:
EFEITOS DO TRATAMENTO COM MELATONINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Londrina
2022

JULIANA MARIA BITENCOURT DE MORAIS VALENTIM

**ESTRESSE OXIDATIVO E INTEGRIDADE CELULAR:
EFEITOS DO TRATAMENTO COM MELATONINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigues Ferreira Seiva

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M828 Morais-Valentim, Juliana Maria Bitencourt.
 Estresse oxidativo e integridade celular : efeitos do tratamento com melatonina em células de carcinoma hepatocelular / Juliana Maria Bitencourt Morais-Valentim. - Londrina, 2022.
 57 f. : il.

 Orientador: Fábio Rodrigues Ferreira Seiva.
 Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.
 Inclui bibliografia.

 1. câncer de fígado - Tese. 2. melatonina - Tese. 3. estresse oxidativo - Tese. 4. mitocôndria - Tese. I. Seiva, Fábio Rodrigues Ferreira. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

JULIANA MARIA BITENCOURT DE MORAIS VALENTIM

**ESTRESSE OXIDATIVO E INTEGRIDADE CELULAR:
EFEITOS DO TRATAMENTO COM MELATONINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Fábio Rodrigues Ferreira
Seiva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fabiano Gonçalves Costa
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Londrina, 21 de outubro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Hoje se encerra mais um ciclo em minha vida, chegar até aqui certamente não foi fácil. Esses dois anos de mestrado foram intensos, com dias de muito esforço, medo, questionamento, ansiedade, lágrimas, mas também dias de conquistas e alegrias. Esse trabalho e posteriormente este título significa muito para mim, tem o significado de superação. Superação das minhas limitações como mulher, mãe, esposa, filha e amiga.

Recordo-me de quando prestei a prova em novembro de 2019 e fui reprovada e questionei-me sobre a minha capacidade e metas. Porém, não desisti e em maio de 2020 retornei a fazer a prova do programa e fui aprovada, nesse momento quem acreditou no meu trabalho foi o meu orientador. E quando começaram as disciplinas e me deparei com o grau de dificuldade, eu queria desistir e não foi uma e nem duas vezes, mas sim várias, pois novamente me questionava do que era capaz.

Mas a minha força de vontade é saber de onde eu vim e para onde quero chegar, além da minha rede de apoio que é maravilhosa, percebi que era possível alcançar o que almejava, mas com toda certeza não seria possível chegar até aqui sem vocês, por isso, diante a todas as experiências, lutas e conquistas nesses dois anos, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, a Deus que seu fôlego de vida em mim foi dado o sustento e a coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades. Abençoando minha caminhada durante a vida, me iluminando, me guiando, tranquilizando através de seus louvores e orações. Sem ele, não teria forças para concluir esta jornada, pois eu acredito, entrego e confio em ti, pois seus planos são melhores que o meu.

Agradeço aos meus pais Luciana Bitencourt e Adilson Moraes, que nunca mediram esforços para que eu pudesse conquistar e realizar os meus sonhos e proporcionaram uma boa qualidade de vida. Sempre estiveram ao meu lado, a eles devo à vida, pelo tanto que fizeram e fazem por mim. Em especial, a minha mãe que deixou seu lar para viver comigo por um período aqui em Londrina, para que eu pudesse finalizar esse trabalho. À minha irmã Pâmela Bitencourt, que mesmo de longe sempre se

preocupou comigo e não mede esforço para minha realização. Eu amo muito vocês!

Aos meus avôs maternos Odete Bitencourt e José Bitencourt, que sempre estiveram preocupados com a minha formação, ajudando de todas as formas possíveis. Vocês são exemplos de vida para mim, me mostrando que mesmo com as dificuldades, sempre há uma vitória no fim de uma batalha. Sei que nosso contato durante esses dois anos foi bem menor pela distância e circunstância e espero que eu possa correr atrás do tempo “perdido”.

Ao meu esposo Murillo Valentim, não tenho palavras para descrever o quão importante ele foi nesse processo de formação que sempre me apoiou e incentivou, para que pudesse participar e desenvolver todos os projetos, me ouvindo nos momentos de desespero e servindo de exemplo mostrando como ser determinada e acreditar que devemos desfrutar das oportunidades da pós-graduação. Você certamente é o único que verdadeiramente conhece todas as minhas dificuldades encontradas nessa jornada. Obrigada pela paciência, sabedoria e cuidado que teve comigo, e por lutar e sonhar junto comigo.

Agradeço em especial ao meu filho Ravi Bitencourt Valentim, que fez parte desse momento tão importante da minha vida, e que é por ele e para ele que dedico esse diploma. Ele é o motivo pelo qual eu lutei e lutarei até o último dia da minha vida pelo seu bem-estar, sua educação e sua formação. Eu te amo e obrigada por me ensinar a ser melhor todos os dias, você é o combustível para que eu possa buscar a minha melhor versão.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Rodrigues Ferreira Seiva, por orientar desde 2017 com o projeto de Iniciação Científica, Trabalho de Conclusão de Curso e permaneceu me orientando até o presente momento na pós-graduação, sou grata pela rica oportunidade de estar aprendendo ao seu lado.

Agradeço também ao Prof. Dr. Wander Pavanelli que desde o início dessa jornada abriu as portas do laboratório para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada por todo o acolhimento e ensinamento por todo esse tempo de parceria e por ser presente diariamente no laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Chuffa, Prof. Dr^a Glaura Scantamburlo,

Prof. Dr^a Danielle Bidoia que contribuíram para que esse projeto fosse realizado, não só apenas cedendo seus laboratórios, mas também com toda suas experiências e ensinamentos. E a Prof. Dr^a Idessania Costa pelos ensinamentos.

Agradeço também à minha amiga Yasmin Munhoz, que foi o meu encontro de almas, minha melhor amiga de laboratório e vida londrinense. Obrigada por compartilhar sua vida profissional e pessoal com a minha família, certamente a caminhada foi mais leve ao seu lado. Nunca esquecerei o quão importante você foi nesse processo.

Agradeço também à Virgínia Concato por toda ajuda nesses dois anos de laboratório, ela me ensinou tudo o que hoje apresento aqui, obrigada por me ensinar, ajudar, que Deus te abençoe, ela foi minha mentora nesses anos. Obrigada por todo tempo dedicado.

Também gostaria de agradecer meus outros amigos do laboratório LIDNC, Ellen, Mariana, Ana Carolina, Amanda, Taylon, Fabrício, Elaine, Bruna, Angélica, Manoela e Fernanda, vocês tornaram a caminhada mais leve, divertida, me ensinaram, me incentivaram e ajudaram muito, sempre dispostos a fazer o que fosse preciso para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira, eu sou eternamente grata a cada um de vocês e vou levar um pouquinho de cada um para sempre comigo.

Por último, mas não menos importante, agradeço a Universidade Estadual de Londrina (UEL), uma universidade pública com ensino de qualidade ao qual faço parte hoje. Deixo aqui meu agradecimento aos demais professores que tive prazer de conhecer e aprender com eles durante essa jornada da pós-graduação. Ao Programa de Patologia Experimental pela oportunidade e privilégio de aprender mais e à CAPES pelo suporte financeiro.

Sou grata por ter pessoas tão especiais que não mediram esforços para a minha formação!

“Gostaria que você soubesse que existe dentro de si uma força capaz de mudar sua vida,
basta que lute e aguarde um novo amanhecer”.

(Margaret Thatcher)

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis”.

(José de Alencar)

RESUMO

MORAIS-VALENTIM, Juliana Maria Bitencourt. **Estresse oxidativo e integridade celular:** efeitos do tratamento com melatonina em células de carcinoma hepatocelular. 2022. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia primária de fígado, agressiva, com alta capacidade metastática e baixa responsividade aos quimioterápicos disponíveis, além disso, seu diagnóstico é normalmente tardio, resultando em um mau prognóstico. Diversos estudos buscam por compostos alternativos que demonstrem potencial antiproliferativo e que combatam as células tumorais do fígado. A melatonina (Melatonina), uma indolamina secretada pela glândula pineal e em menor quantidade em outros órgãos como o fígado, apresenta atividade antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*, porém os mecanismos envolvidos ainda carecem de esclarecimento. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da Melatonina em células de CHC (HuH7.5) sobre vias de morte celular e estresse oxidativo. A linhagem celular HuH7.5 foi tratada por 24h, 48h e 72h com Melatonina (0,5 – 4,0 mM) e, posteriormente foi definido a concentração citotóxica de 50% nos dois tempos (3,891 mM \pm 0.03 e 1,746 mM \pm 0.01). Os demais experimentos utilizaram as concentrações de 2 mM e 4 mM, pelos mesmos períodos. O tratamento com Melatonina aumentou biomarcadores do estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio, malonaldeído, óxido nítrico e ânion superóxido e reduziu as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione-s-transferase. A Melatonina induziu disfunção mitocondrial, aumento de formação de corpos lipídios e vacúolos autofágicos, bem como, provocou a parada de ciclo celular na fase G1, desencadeando apoptose. Portanto, a Melatonina apresentou relevantes efeitos antitumorais em células Huh7.5; seu uso como adjuvante em quimioterapias para o tratamento do CHC deve ser investigado em detalhes.

Palavras-chave: câncer de fígado; melatonina; estresse oxidativo; mitocôndria; Huh7.5.

ABSTRACT

MORAIS-VALENTIM, Juliana Maria Bitencourt. **Oxidative stress and cellular integrity:** effects of melatonin treatment on Hepatocellular carcinoma. 2022. 57 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary liver neoplasm, aggressive, with high metastatic capacity and low responsiveness to available chemotherapeutics; moreover, its diagnosis is usually late, resulting in a poor prognosis. In this context, several studies have searched for alternative natural compounds that show antiproliferative potential and that respond to the action of liver tumor cells. Melatonin (Honey), an indolamine secreted by the pineal gland and in smaller amounts in other organs, such as the liver, shows antitumor activity both in vitro and in vivo. Therefore, the present study aimed to investigate the cytotoxic effect of Honey on HCC cells (HuH7.5). The HuH7.5 cell line was treated for 24, 48 and 72 h with Honey (0.5 - 4.0 mM), subsequently the 50% cytotoxic concentration was set at the three times ($3.891 \text{ mM} \pm 0.03$; $1.746 \text{ mM} \pm 0.01$; $1.570 \text{ mM} \pm 0.01$), of which remained the times of 24 and 48 h in the concentrations of 2 mM and 4 mM, The treatment with melatonin demonstrated biomarkers of oxidative stress more evident, such as reactive oxygen species, malonaldehyde, nitric oxide and superoxide anion and attenuated the parameters of antioxidants being superoxide dismutase, catalase, reduced and oxidized glutathione, glutathione-s-transferase and total glutathione. Consequently, melatonin showed in these cells mitochondrial dysfunction, increased formation of lipid bodies and autophagic vacuoles, as well as, induced cell cycle arrest in the G1 phase, triggering apoptosis. Therefore, Melatonin revealed that it may be a promising candidate for the development of antitumor drugs due to its action on this tumor cell.

Key words: liver cancer; melatonin; oxidative stress; mitochondria; Huh7.5.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas da carcinogênese	13
Figura 2 – Incidência e mortalidade por câncer.....	15
Figura 3 – Etiologias envolvidos na progressão do carcinoma hepatocelular ...	16
Figura 4 – Alterações genéticas que ocorrem no CHC	17
Figura 5 – Contribuição das espécies reativas de oxigênio (ERO) desenvolvimento do CHC e sua produção em organelas	23
Figura 6 – Metabolismo das espécies reativas de oxigênio (ERO)	25
Figura 7 – Atuação da melatonina em ações celulares	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CHC	Carcinoma hepatocelular
DNA	do inglês, Deoxyribonucleic acid
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSHPx	Glutationa peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IARC	do inglês, International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MT1	Receptores específicos de membrana 1
MT2	Receptores específicos de membrana 2
mM	Milimolar
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NO	Do inglês, nitric oxide
NO ⁻	Ânion nitroxil
NOX	Número de oxidação
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
RL	Radical Livre
RE	Retículo endoplasmático
RO	Radical alcóxi
SCN	Supraquiasmático
SOD	Superóxido dismutase
μM	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CÂNCER.....	12
2	CÂNCER DE FÍGADO	14
2.1	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	14
2.2	HEPATOCÂRCINOGENESE.....	16
2.3	LINHAGEM CELULAR	18
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO	20
3	MELATONINA	25
4	JUSTIFICATIVA	29
5	OBJETIVOS	29
5.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
5.2	OBJETIVOS GERAIS	29
6	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	30
7	CONCLUSÃO GERAL	49
	REFERÊNCIA	49

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CÂNCER

4

5 Para se tornar uma célula tumoral, a célula normal deve adquirir
6 determinadas mutações ou alterações genéticas/epigenéticas, características,
7 como autossuficiência de sinais externos para ativar o ciclo celular, insensibilidade
8 a sinais antiproliferativos, imortalidade replicativa, reprogramação do metabolismo
9 energético, evasão dos mecanismos de apoptose, senescência e inflamação, bem
10 como capacidade de invadir e metastatizar (PINHO; REIS, 2015.; TAKESHIMA;
11 USHIJIMA, 2019).

12 Genes que controlam funções de crescimento, sobrevivência,
13 invasão e motilidade têm suas expressões aumentadas em células malignas;
14 aqueles com função de suprimir esses eventos, apresentam inibição ou redução na
15 expressão; como consequência ocorre a multiplicação celular descontrolada. As
16 mutações envolvidas na carcinogênese podem ser causadas por compostos
17 químicos, fatores ambientais, estilo de vida e ainda por infecções por
18 microrganismos como vírus, bactérias e fungos (BLACKADAR, 2016).

19 O processo carcinogênico pode ocorrer de maneira gradual,
20 levando vários anos para que uma única célula cancerosa se desenvolva e dê
21 origem ao tumor. Para o desenvolvimento do tumor, a célula passa por diversos
22 estágios de crescimento e adaptação, os quais são resumidos em três etapas:
23 iniciação, promoção e progressão (**FIG 1**) (LIU et al., 2015).

24

25

26

27

28

29

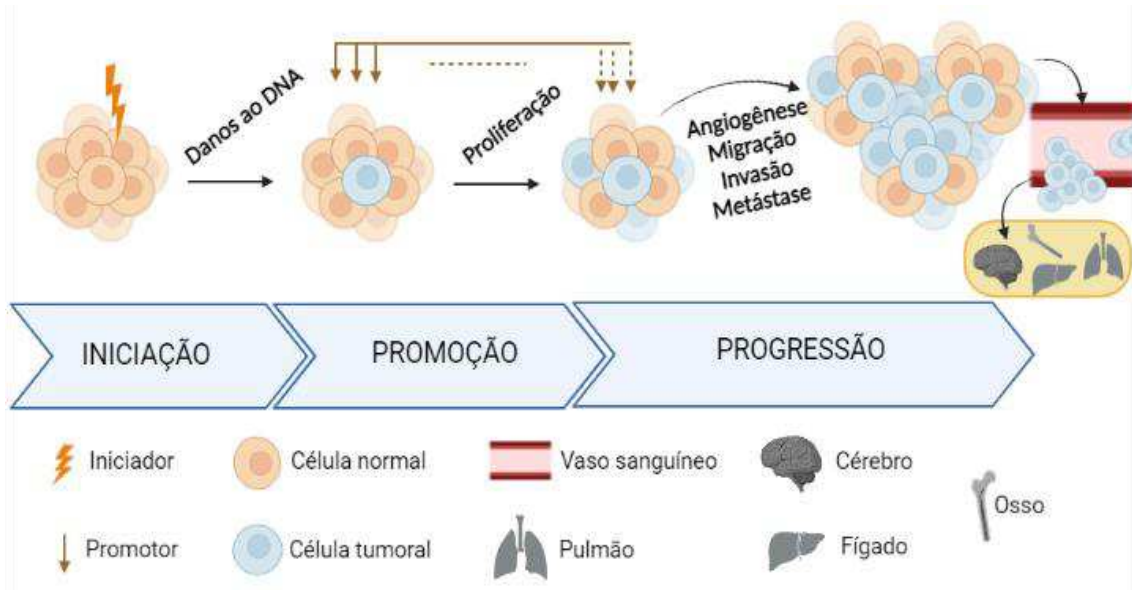
30

31

32

33

1 **Figura 1:** Etapas da carcinogênese.



2

3 **Fonte:** adaptado de LIU et al., 2015. Biorender.

4

5

6 A iniciação é o primeiro estágio do desenvolvimento do tumor.
 7 Nesta fase, moléculas iniciadoras (agentes cancerígenos ou carcinógenos) entram
 8 em contato com o microambiente celular e causam danos ao DNA, os quais se não
 9 são corretamente reparados, podem produzir mutações. Quanto maior a exposição
 10 a essas moléculas iniciadoras, maior é o risco do desenvolvimento do tumor
 (IRIGARAY; BELPOMME, 2010).

11

12 A promoção, o segundo estágio, ocorre em células já iniciadas
 (mutadas). Agentes promotores têm o papel de aumentar a taxa proliferativa,
 13 criando um maior número de células portadoras de mutações. Os agentes
 14 promotores não têm efeito direto sobre o DNA, mas sim em receptores celulares,
 15 levando a alteração de vias de sinalização e ao aumento de replicação celular. Os
 16 promotores podem ainda ser divididos em duas categorias: promotores específicos,
 17 que interagem com receptores em células alvo e promotores não específicos, que
 18 alteram a expressão de genes sem o envolvimento de um receptor conhecido. Os
 19 promotores não levam a formação do tumor de maneira isolada, eles apenas
 20 aumentam a proliferação de células já iniciadas, levando assim a formação de
 21 células malignas (KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000).

22

23 O terceiro e último estágio da carcinogênese é a etapa de
 progressão celular. Este estágio está associado a mudanças no genótipo celular

1 juntamente com o aumento da taxa de proliferação, da capacidade invasiva e
2 metastática, além de alterações bioquímicas (via glicolítica e fosforilação oxidativa)
3 e morfológicas (neoplasias benignas ocorre isomorfismo celular e, neoplasias
4 malignas há anisocitose e pleomorfismo celular, às vezes até com multinucleação)
5 ocasionadas pelo acúmulo de mutações e/ou pela instabilidade genética
6 (OLIVEIRA et al., 2007). Neste nível de desenvolvimento, a formação do tumor é
7 irreversível.

8 O câncer é considerado a primeira causa de morte em muitos
9 países ou regiões e está entre um dos principais problemas de saúde pública
10 (CURTIN, 2019). De acordo com a GLOBOCAN (2020), no período de 2020 a 2040
11 haverá um aumento de aproximadamente 56% no número de casos de câncer no
12 mundo, chegando a 29.532.994. Em relação aos casos de óbitos, os números
13 deverão atingir cerca de 16.388.459 em 2040 (aumento de 63% em relação à
14 2020). Dados do INCA (2019), revelam que no Brasil foram diagnosticados 685.960
15 novos casos em 2020, sendo aproximadamente 35.050 no estado do Paraná.

16

17 **2 CÂNCER DE FÍGADO**

18

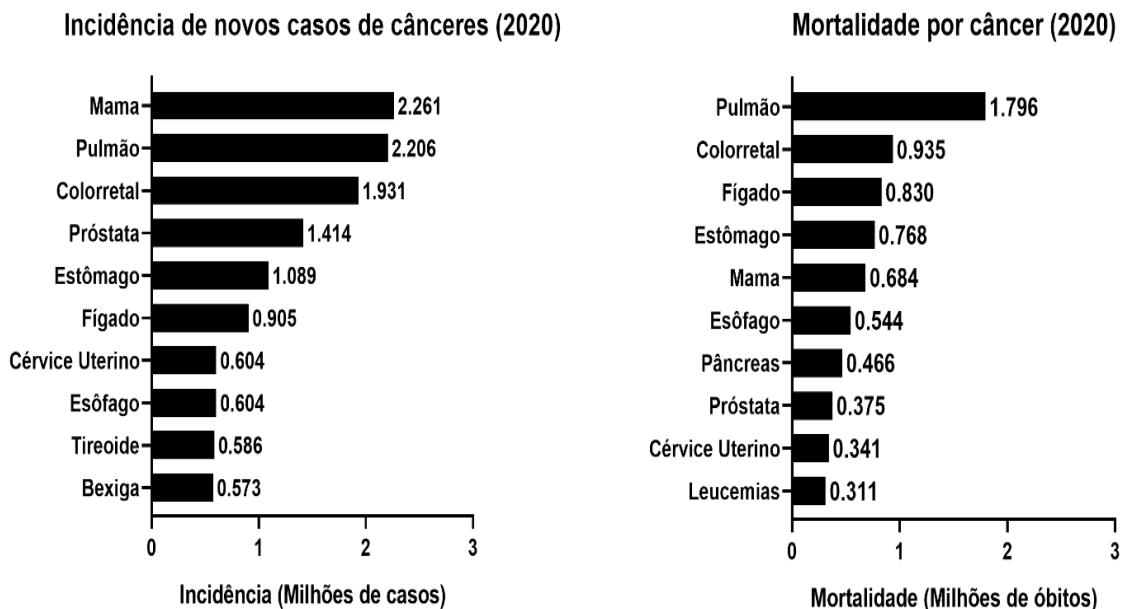
19 2.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

20

21 O câncer de fígado está entre os tipos de tumores mais incidentes,
22 ocupando a sexta posição, e em relação à taxa de mortalidade está entre as três
23 primeiras causas, ficando atrás do câncer de mama e colorretal (**FIG 2**) (MCGLYNN
24 *et al.*, 2020). Estimativas para o ano de 2060 indicam aumento significativo de 1,6
25 milhões de mortes por esse tipo de câncer (INCA, 2019). No Brasil, a incidência
26 desse tipo de câncer é baixa, porém a ocorrência tem sido constante ao decorrer
27 dos anos. Desde 1998, é constatado variação de 1,07 a 9,43 na incidência de novos
28 casos a cada 100 mil homens e de 0,28 a 7,4/100 mil mulheres. Em 2018, o câncer
29 de fígado apresentou aumento de 6,3 e 3,4/100.000 entre homens e mulheres,
30 respectivamente (IARC, 2018). Os números para os casos de câncer de fígado
31 tendem a crescer devido ao aumento da sobrevivência da população, estilo de vida
32 sedentário somado ao consumo de alimentos industrializados, e maior contato com
33 agentes químicos, físicos e biológicos (SUNG et al., 2021).

34

1

2 **Figura 2:** Incidência e mortalidade por câncer mundial.

3

4 **Fonte:** Adaptado de World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC,
5 2020). Estimativa das taxas de incidência e mortalidade mundial dos cânceres que mais afeta a população para
6 o ano de 2020, sem distinção dos sexos.

7

8 Dentre os tipos de tumores que acometem o fígado, o carcinoma
9 hepatocelular (CHC) é o mais frequente e o principal subtipo responsável por até
10 90% dos casos (RUMGAY, 2021) seguido pelo colangiocarcioma (KEW, 2017). O
11 CHC pode se originar a partir dos hepatócitos, epitélio ducto biliar ou tecido
12 mesenquimal. Sua incidência aumenta conforme a idade e acomete de 4 a 8 vezes
13 mais o sexo masculino devido ao estilo de vida (SHI,C et al, 2020). Existem diversos
14 fatores etiológicos no desenvolvimento do CHC, incluindo as hepatites virais,
15 tabagismo, alimentos contaminados com aflatoxina B1 (substâncias tóxicas
16 produzidas por fungos), consumo excessivo de álcool, fibrose hepática, doença
17 hepática não alcóolica, diabetes e obesidade (**FIG 3**) (ARAVALLI, 2013).

18

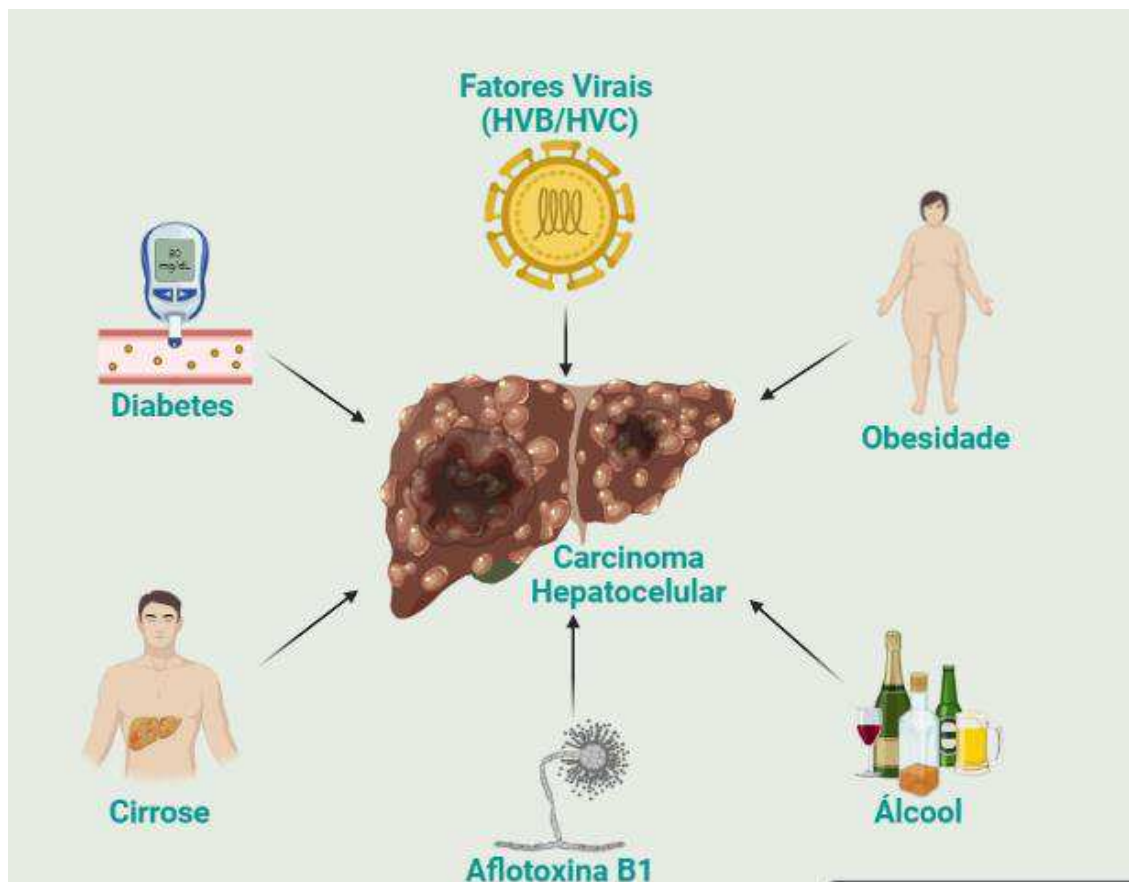
19

20

21

22

1 **Figura 3:** Etiologias envolvidas na progressão do carcinoma hepatocelular.



2
3 **Fonte:** Adaptado Lafaro et al., 2015. Biorender.
4
5

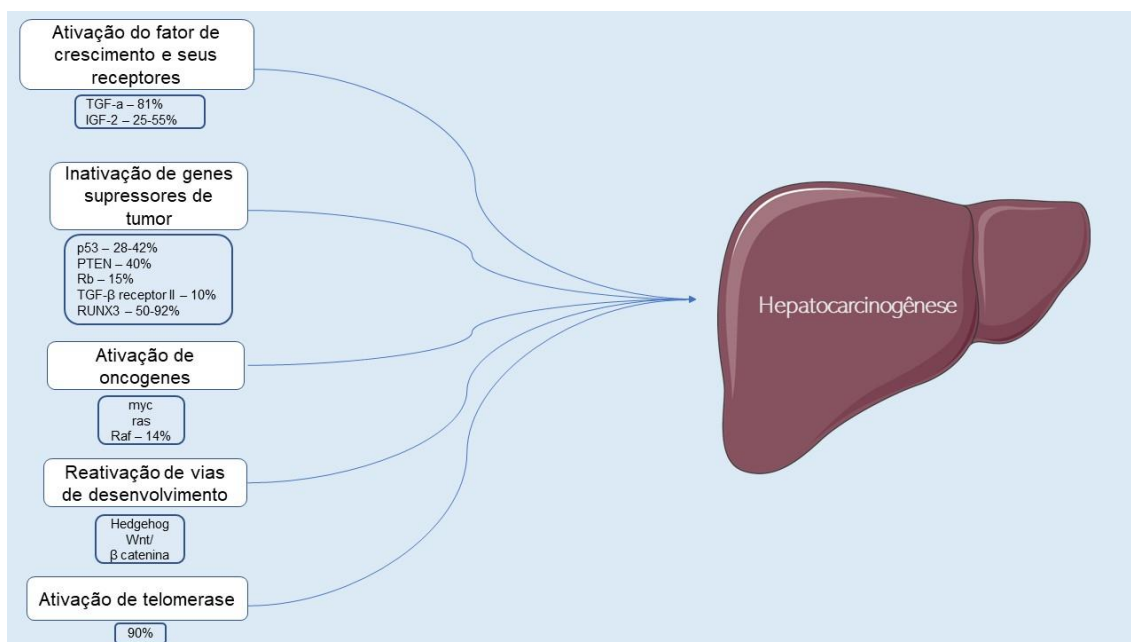
6 2.2 Hepatocarcinogênese

7 A hepatocarcinogênese representa um processo complexo no qual
8 populações monoclonais sucessivamente mais aberrantes de hepatócitos tendem
9 a um ambiente inflamatório com constante injúria hepática e regeneração de tecido
10 fibroso, podendo evoluir à cirrose (FORNER; REIG; BRUIX, 2018). Hepatócitos
11 regenerativos em lesões focais no fígado inflamado (hepatite crônica ou cirrose)
12 originam-se de nódulos de hepatócitos hiperplásicos, e estes prosperam para
13 nódulos displásicos, que são os precursores direto do CHC (COLEMAN, W.B.,
14 2003). Na maioria dos casos, a neoplasia dos hepatócitos resulta do acúmulo de
15 danos genéticos durante a proliferação celular que ocorre no fígado lesado em
16 resposta a fatores de crescimento parácrinos e citocinas de estimulação
17 (SCHULZE; NAULT; VILLANUEVA, 2016).

18 O CHC exhibe inúmeras alterações genéticas (incluindo deleções,
19 rearranjos, aneuploidia, ampliações de genes e mutações) e epigenéticas

1 (incluindo modulação da metilação do DNA) (MARQUARDT; ANDERSEN;
 2 THORGEIRSSON, 2015). Essas alterações combinadas ativam mediadores
 3 positivos da proliferação celular (incluindo proto-oncogenes celulares e suas vias
 4 de sinalização mitogênica) e inativam os mediadores negativos da proliferação
 5 celular (incluindo genes supressores de tumor), resultando em células com
 6 potencial de crescimento autônomo (**FIG 4**) (TORRECILLA et al., 2017). Além
 7 disso, existem várias vias de sinalização envolvidas na patogênese do CHC,
 8 incluindo vias de ciclo celular, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, autofagia
 9 e apoptose. A identificação dessas vias fornece uma oportunidade para identificar
 10 novos alvos que podem ser utilizados para o desenvolvimento terapêutico (DIMRI,
 11 M; SATYANARAYANA,A., 2020; SINGH *et al.*, 2018; DUBBELBOER *et al.*, 2019).
 12

13 **Figura 4:** Alterações genética que ocorrem no CHC. Existem cinco grupos
 14 principais de genes que são alterados durante o processo do CHC, dentre eles
 15 alterações genéticas de fatores de crescimento e genes supressores de tumor que
 16 ocorrem frequentemente no CHC.



17

18

Fonte: Adaptado de SHIRAHARA, H; YAMAMOTO, K; NAMBA, M (2013).

19

20

21

A terapia atual convencionalmente utilizada para câncer de fígado é a quimioembolização e a administração de Sorafenib, um inibidor de enzimas quinases (JAKOBI et al., 2020). Apesar disso, existem novas alternativas,

22

1 as quais também podem ser empregadas para o tratamento de CHC, dentre essas
2 opções fármacos com mecanismos semelhantes ao Sorafenib como o
3 Regorafenibe e o Lenvatinibe, os quais são direcionados à terapia alvo molecular
4 que apresenta efetividade ao tratar o câncer e ao mesmo tempo ocasiona danos
5 menores aos tecidos normais sendo, portanto, uma alternativa mais segura e
6 tolerável aos pacientes. Estão sendo estudados como potenciais alvos de
7 tratamento também uma classe medicamentosa direcionada a antígenos
8 específicos do câncer, como os medicamentos direcionados ao Glypican-3 ou a α -
9 fetoproteína. Esses fármacos levam a uma resposta imune celular específica,
10 sendo, portanto, uma alternativa bem direcionada para antígenos tumorais. Ainda
11 na imunoterapia algumas pesquisas têm como foco o desenvolvimento de fármacos
12 direcionados ao controle imunológico, os quais causam um bloqueio específico que
13 pode ativar a resposta autoimune e melhora a resposta contra o câncer (MA, LIU
14 et al. 2020). Por fim, algumas opções terapêuticas classicamente utilizadas incluem
15 cirurgias (hepatectomia parcial ou transplante de fígado), tratamento local (ablação
16 ou embolização), radioterapia e quimioterapia (GOMES et al. 2013).

17 O tratamento realizado pode ser tanto feito utilizando apenas uma
18 das terapias citadas ou feita a combinação de duas ou mais terapias de acordo com
19 cada caso. Os fatores que determinam o tratamento mais apropriado a ser
20 selecionado incluem o tamanho e local do tumor, o estado e função hepática e
21 condições do paciente (PAGE et al, 2014). Sabe-se que o tratamento do CHC ainda
22 carece de intervenções farmacológicas mais efetivas, devido, em parte, à baixa
23 taxa de resposta às medicações atuais e à alta taxa de recorrência, tornando a
24 busca por terapias alternativas um campo promissor para pesquisas.

25

26 **2.3 Linhagem Celular**

27 A homogeneidade da população celular, em estudos *in vitro*, assegura vários
28 ciclos de replicações relativamente seguras, porém essa característica é também
29 descrita como uma limitação desse tipo de estudo, pois tumores *in vivo* são,
30 normalmente bastante heterogêneos em termos celulares (AO, N; CHEN, Q; LIU,
31 G, 2017). Existem diversas linhagens celulares do CHC (Huh-7, HuH7.5, HuH7.5.1,
32 HepG2, Hep3B, HLE, HLF, JHH-5, JHH-7, Bell-7402, SNU-449, dentre outras),
33 sendo que células de um mesmo tipo de tumor, como CHC, podem diferir nas

1 respostas à tratamentos e nos mecanismos moleculares envolvidos na progressão
2 da doença. Por exemplo, HuH7, HepG2 e Hep3B são três linhagens celulares bem
3 diferenciadas com propriedades epiteliais que se encaixam no estágio inicial,
4 enquanto HLE, HLF e SNU-449 são pouco diferenciados, com características de
5 células mesenquimais e representam estágios tardios da doença (COULOUARN, C
6 ET AL, 2008; YUZUGULLU, H ET AL, 2009; NWOSU, BATTELLO ET AL. 2018).

7 As linhagens bem diferenciadas citado anteriormente, são as mais
8 utilizadas em pesquisas sobre o metabolismo das células hepáticas e na avaliação
9 de diversas ações de drogas, dentre elas a HepG2 (GERETS et al., 2012). Essas
10 células exibem muitas das características genotípicas das células hepáticas
11 normais (SASSA et al. 1987). Conseqüentemente, as células HepG2 podem ser
12 usadas para rastrear o potencial de citotoxicidade de novas entidades químicas na
13 fase de geração de chumbo, por exemplo (GERETS et al. 2009). No entanto, sua
14 principal limitação está ligada às suas baixas capacidades metabólicas em
15 comparação com os hepatócitos primários (XU et al. 2004), o que os torna
16 apropriados para testar a toxicidade da molécula original, mas menos adequados
17 para testes de toxicidade de metabólitos. Sendo assim, foi se originando outras
18 células como já destacado, como é o caso da HuH7.

19 Células HuH7 são conhecidas por apresentarem semelhanças com
20 os tumores humanos em relação quantidade HMGs suprarregulados, (padrão de
21 expressão desses genes metabólicos derivados de tecido CHC) que estão
22 envolvidos no metabolismo de glicanos, lipídios de membrana, colesterol,
23 lipogênese e transporte de pequenas moléculas (NWOSU, BATTELLO ET AL.
24 2018). Além disso, essa linhagem apresenta baixa migração, proliferação. Desta
25 forma, enfatizamos a linhagem celular HuH7.5 célula derivada da linhagem HuH7,
26 utilizada como linhagem substituta experimental conveniente para hepatócitos
27 primários e altamente permissiva de replicar o RNA de VHC com o seu genoma
28 (BLIGHT et al., 2002; KAWAMOTO, YAMAJI et al. 2020).

29 HuH7.5 expressa alto nível de muitos alvos metabólicos
30 consistentemente regulados positivamente em microarrays de pacientes com CHC
31 (por exemplo, *AKR1B10*, *SQLE*, *LYZ*, *PLCB1*) levantando assim, a questão de se
32 HuH7.5 poderia identificar biomarcadores metabólicos de CHC (FEIGELSTOCK,
33 D.A; MIHALIK, K.B; KAPLAN, G; FEINSTONE, S.M,2010).

1 É necessário pontuar que linhagens HepG2 e Huh7 diferem na
2 tolerância e sensibilidade à doxorrubicina, sorafenib e melatonina, sugerindo
3 mecanismos de sobrevivência celular distintos (DUBBELBOER *et al.*, 2019), o que
4 é crucial para que possamos desenvolver tratamentos adequados para cada
5 linhagem tumoral.

7 **2.4 Estresse oxidativo**

8 O estresse oxidativo (EO) refere-se ao aumento exacerbado de
9 espécies reativas de oxigênio (ERO) ou outros Radicais Livres (RL)
10 concomitantemente com a redução da capacidade antioxidante celular. EO está
11 relacionado a diversas doenças, como câncer, e doenças neurodegenerativas,
12 cardiovasculares e diabetes (BRAHMA, M.K et al, 2022). No câncer, ERO estão
13 envolvidas na proliferação e progressão do ciclo celular, sobrevivência e apoptose
14 celular, metabolismo energético, morfologia celular, adesão célula-célula,
15 motilidade celular, angiogênese e manutenção do tronco tumoral (YARH, G;
16 STORZ, P., 2014).

17 As ERO são subprodutos de uma série de reações bioquímicas
18 envolvidas no consumo de oxigênio e do metabolismo celular formadas pela
19 redução parcial do oxigênio molecular (ZOROV, D.B; JUHASZOVA, M; SOLLOTT,
20 S.J, 2014). As ERO são produzidas em diferentes compartimentos de uma célula
21 **(FIG 5)**, como citosol, mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático (SIES
22 H, JONES DP. 2020). Essas organelas também podem atuar como scavengers
23 pela ação de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para prevenir
24 danos oxidativos (BRAHMA, M.K et al, 2022).

25 Algumas ERO, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não são muito
26 reativas em relação ao DNA e a maioria dos efeitos danosos no DNA são devidos
27 aos íons hidroxila, que são gerados por meio da reação de Fenton (IMLAY JA, CHIN
28 SM, LINN S., 1988). Nesta reação, metais de transição como ferro e cobre doam
29 ou aceitam elétrons livres durante as reações intracelulares e usam H₂O₂ para
30 catalisar a formação de radicais livres. Os radicais hidroxilas atacam o DNA
31 rapidamente devido à sua alta difusibilidade, o que resulta na formação de lesões
32 no DNA, incluindo bases de DNA oxidadas, quebras de fitas simples e duplas
33 (YARH, G; STORZ, P., 2014). Os adutos de DNA são removidos pelas vias de

1 reparo por excisão de base ou reparo por excisão nuclear (MITRA, S et al, 2001). As
2 células incapazes de reparar completamente as lesões do DNA (ou seja, devido à
3 deficiência de enzimas de reparo do DNA) sofrem apoptose para garantir que essas
4 mutações não sejam transmitidas às células descendentes.

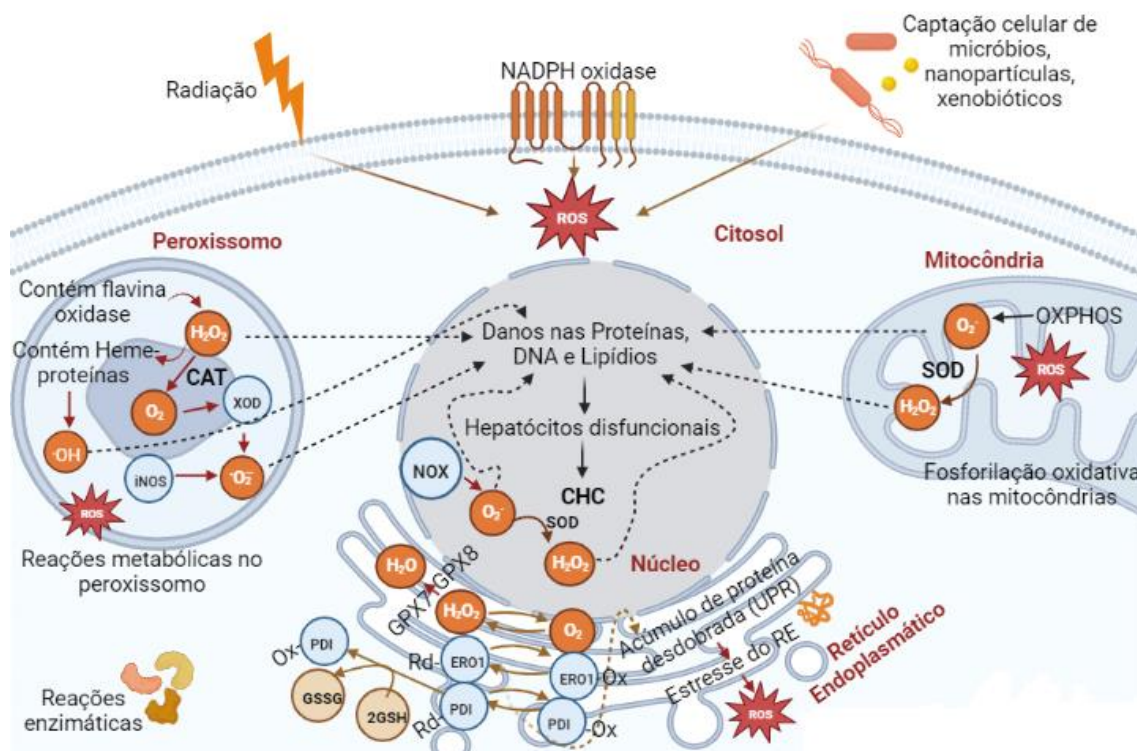
5 No entanto, sob certas circunstâncias, as células que abrigam
6 mutações de DNA escapam com sucesso da morte celular programada, o que
7 aumenta a chance de crescimento cancerígeno. Outros alvos celulares de ROS são
8 os lipídios, como ácidos graxos poli-insaturados, para iniciar a peroxidação lipídica
9 (NORTH, J.A; SPECTOR, A.A; BUETTNER, G.R., 1994; GARNER, H.W, 1989). A
10 oxidação lipídica gera inúmeras moléculas genotóxicas, como malondialdeído, 2-
11 alquenais e 4-hidroxi-2-alquenais (BURCHA PC., 1998; CATALA, A 2009). A
12 peroxidação lipídica induzida por ROS pode ser usada como marcador tumoral
13 (LAUSCHKE H, ET AL, 2002). Por exemplo, a detecção de substâncias reativas ao
14 ácido tiobarbitúrico indica alto nível de peroxidação lipídica.

15 As células tumorais apresentam um equilíbrio redox alterado em
16 relação às células normais, o que pode ser alvo de terapias antitumorais,
17 aumentando os níveis de ERO e diminuindo a capacidade do sistema antioxidante,
18 levando à apoptose (YARH, G; STORZ, P., 2014). A sinalização redox é mediada
19 por ROS onde desempenha papel fisiológico e participa em eventos de proliferação,
20 diferenciação, resposta ao estresse e sobrevivência celular (TRACHOOTHAM, D;
21 ALEXANDRE, J; HUANG, P. 2009). Os danos ocasionados pelas ERO são diversos
22 e afetam a expressão gênica, crescimento e diferenciação celular, modulam
23 reações metabólicas, induzem e respondem a fatores de transcrição, além de
24 atuarem como moléculas sinalizadoras intra e intercelulares (RAHAL *et al.*, 2014;
25 KURUTAS, 2016).

26

27 **Figura 5:** Contribuição das espécies reativas de oxigênio (ERO) desenvolvimento do CHC
28 e sua produção em organelas. A produção excessiva de EROs em diferentes
29 compartimentos celulares pode sobrecarregar os sistemas antioxidantes, causando danos
30 oxidativos a diferentes componentes celulares, afetando as funções celulares e,
31 eventualmente, levar à carcinogênese. Existem três organelas presente nesse processo:
32 mitocôndria, peroxissomo e reticulo endoplasmático. A mitocôndria produz ATP através do
33 oxigênio no processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), em que esse oxigênio é
34 convertido em partes em ânion superóxido (O_2^-), porém O_2^- é tóxico para nossas células,

1 portanto, sua eliminação ocorre pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD) em H_2O_2 . O
 2 peroxissomo é organela rica em proteínas e contém flavinas oxidases, essas proteínas
 3 contêm heme que produzem $\cdot OH$ a partir de H_2O_2 pela reação de Fenton, e as flavias
 4 oxidases transferem elétrons de vários metabólitos e reduzem o oxigênio a H_2O_2 . Estas
 5 enzimas incluem a xantina oxidorreductase (XOD), que com modificações pós-traducionais,
 6 XOD também reduz O_2 para O_2^- . Também está presente no peroxissomo dos hepatócitos
 7 o óxido nítrico sintase (iNOS) que também pode gerar O_2^- . No retículo endoplasmático
 8 (RE) o processo de dobramento oxidativo de proteínas envolve enzimas como a proteína
 9 dissulfeto isomerase (PDI) e a ER oxidorreductina 1 (ERO1) que produz H_2O_2 . NADPH
 10 oxidase 4 (NOX4) e citocromo P450 (CYP) também estão presentes no RE, representando
 11 outras fontes de H_2O_2 , que é então sequestrado pelas peroxidases GPX7 e GPX8. Além
 12 disso, o acúmulo de proteínas desdobradas leva ao estresse do RE e estimula a produção
 13 de EROs. No núcleo, o NOX também é uma fonte O_2^- , que pode ser eliminada pela SOD
 14 em H_2O_2 .



15

16 **Fonte:** Adaptado de BRAHMA, M.K et al (2021).

17

18

19

20

21

Para evitar danos que EO causa, as células possuem sistemas
 antioxidantes (**FIG 6**) que podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos. Dentre as
 principais enzimas cita-se superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona
 peroxidase (GSHPx), glutiona redutase (GSH-Rd), entre outras. Antioxidantes

1 não-enzimáticos podem ser vitaminas (α -tocoferol), metais (selênio), NADPH,
2 tioredoxina e o glutathione (GSH) (SARANGARAJAN *ET AL.*, 2017). Importante
3 salientar que um antioxidante para ser eficiente não necessariamente precisa ser
4 ubíquo, mas sim ser capaz de reagir rapidamente com RL, atravessar barreiras
5 biológicas, não ter uma taxa de excreção elevada, estar disponível quando
6 necessário e estar em concentrações adequadas na célula. Desta forma
7 antioxidantes devem ser “reciclados” ou gerados a partir da circulação de maneira
8 eficiente. Uma outra maneira das células se protegerem indiretamente contra os
9 efeitos deletérios do EO é a macroautofagia, estes são processos responsáveis
10 por evitar que organelas ou macromoléculas danificadas ativem mecanismos que
11 culminem com a morte celular (Lee *et al.*, 2020).

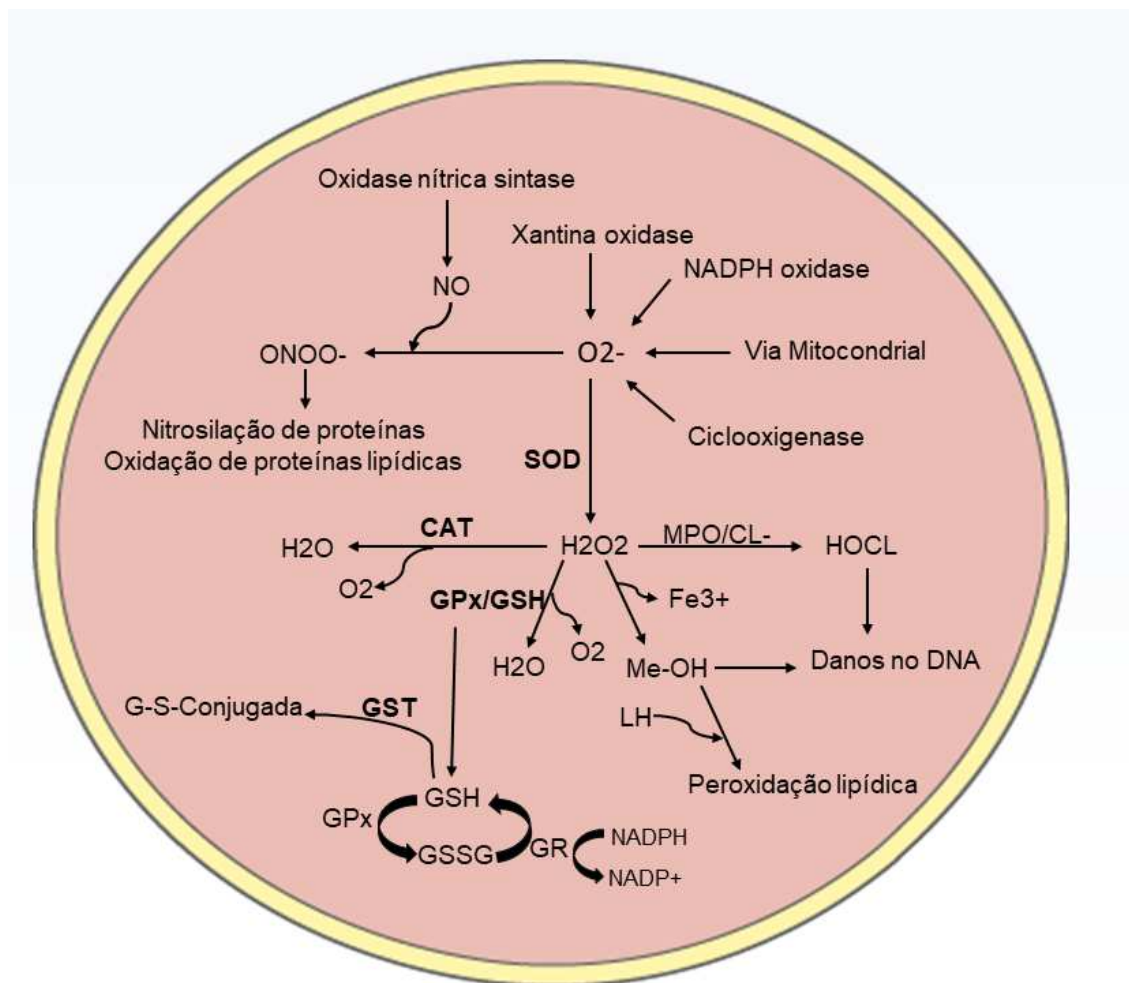
12 SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do ânion
13 superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Ela existe ubiquamente em
14 eucariotos e procariotos. A superóxido dismutase utiliza íons metálicos como cobre
15 (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), manganês (Mn^{2+}) ou ferro (Fe^{2+}) como cofatores (YARH,
16 G; STORZ, P., 2014). As diferentes enzimas SOD estão localizadas em diferentes
17 compartimentos da célula e são altamente específicas na regulação de processos
18 biológicos ligados (COPIN JC, GASCHÉ Y, CHAN PH.,2000). A CAT facilita a
19 decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A principal
20 localização da catalase na maioria dos eucariotos é no citosol e peroxissomos
21 (HASHIMOTO F, HAYASHI H., 1990). As peroxirredoxinas são tioredoxinas
22 peroxidases que catalisam a redução de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos
23 orgânicos e peroxinitrito (HOFMANN B, HECHT HJ, FLOHE L, 2002; WOOD, Z.A
24 *ET AL.*, 2003).

25 O sistema glutathione inclui glutathione reduzida (GSH), glutathione
26 redutase, glutathione peroxidases (GPX) e glutathione S-transferases (GST). A
27 glutathione protege as células do estresse oxidativo, reduzindo as ligações dissulfeto
28 das proteínas citoplasmáticas às cisteínas (FORMAN *et al.*, 2009). Durante este
29 processo, a glutathione é oxidada a dissulfeto de glutathione (GSSG). Glutathione
30 peroxidases (GPX) catalisam a quebra de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos
31 orgânicos (URSINI F, *ET AL.*, 1995; BRIGELIUS-FLOHE R,1999). A glutathione
32 redutase (GSH- Rd) reduz o GSSG e reabastece os pools de GSH (PANDA, P.K *et*
33 *al.*,2015). Em condições fisiológicas a GSH é a forma majoritária com sua

1 concentração de 10 a 100 vezes maior do que GSSG. A relação entre as formas
2 reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) das glutatonas é um importante indicador do
3 ambiente redox e, ao mesmo tempo, contribui com mecanismos moleculares
4 associados à proliferação, diferenciação e morte celular na forma de apoptose
5 (DICKINSON; FORMAN, 2002). Glutathione S-transferases (GST) são enzimas de
6 eliminam e catalisam a conjugação de GSH para uma variedade de compostos
7 eletrolíticos exógenos e endógenos (SHARMA R, et al.2004; HAYES, J.D;
8 FLANAGAN, J.U; JOWSEY, I.R., 2005). GST são superexpressos em uma ampla
9 variedade de tumores para regular as vias MAPK e estão envolvidos no
10 desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (TOWNSEND, D.M; TEW,
11 K.D. 2003).

12

13 **Figura 6:** Metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ERO). O_2^- é considerado a
14 espécie reativa de oxigênio “primária” e gerada principalmente pelas mitocôndrias, NADPH
15 oxidase, ciclooxigenase e xantina oxidase. Por um lado, O_2^- pode reagir rapidamente com
16 o NO para formar ONOO altamente reativo que pode modificar alvos proteicos. Por outro
17 lado, O_2^- é dismutado por SOD para H_2O_2 , que tem três destinos principais: (i) H_2O_2 é mais
18 eficientemente eliminado pela catalase, assim como pela glutathione peroxidase (GPX), em
19 H_2O ; (ii) H_2O_2 é decomposto por alguns metais de transição em radical hidroxila reativo
20 (reação de Fenton), que desempenha um papel importante no dano ao DNA ou na
21 peroxidação lipídica; (iii) H_2O_2 é degradado pela mieloperoxidase (MPO) em O_2 e H_2O ,
22 gerando HOCl na presença de cloreto (Cl). Os produtos superóxidos resultantes, peróxido
23 de hidrogênio ou peróxido nítrico ativam o canal de potássio mitocondrial sensível ao ATP
24 (K_{ATP}), levando à perda do potencial de membrana mitocondrial ($mt\Psi$) com a formação
25 subsequente de mtROS. mtROS facilitam a abertura do poro de transição de
26 permeabilidade mitocondrial (mPTP) e subsequente escape de mtROS para o citosol, onde
27 causam ativação adicional de PKC e NADPH oxidase em conjunto com o aumento do cálcio
28 intracelular.



1

2 **Fonte:** próprio autor.

3

4 **3 MELATONINA**

5

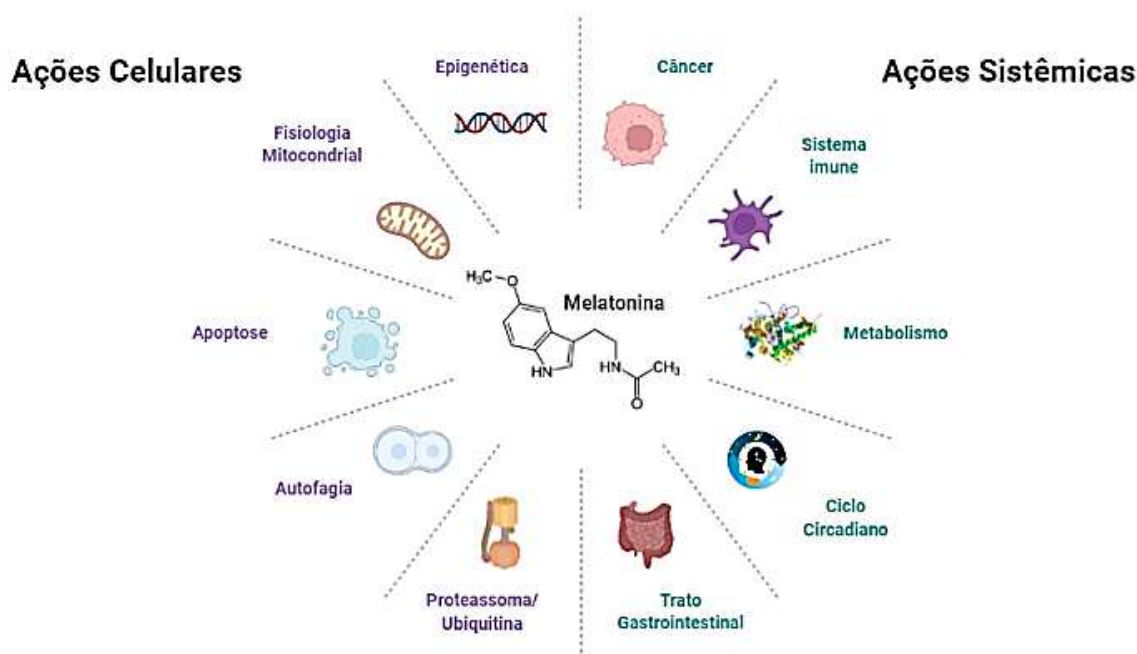
6 A Melatonina ou N-acetil-5-metoxitriptamina é um hormônio
 7 lipofílico que possui efeitos sistêmicos e celulares já descritos na literatura (**FIG 7**)
 8 (REITER et al, 2020). Sua descoberta ocorreu em 1958 pelo médico dermatologista
 9 Aaron Lerner (LERNER, A.B; CASE, J.D; TAKAHASHI, D., 1960). Seu nome é
 10 devido à sua capacidade de causar contração de melatoninanóforos encontrados
 11 em sapos, ocasionando clareamento na pele desses animais (CLAUSTRAT, B;
 12 BRUN, J; CHAZOT, G, 2005). A Melatonina demonstra alta solubilidade em lipídeos
 13 facilitando sua passagem por meio das membranas celulares e podendo transpor
 14 a barreira hematoencefálica (NETO, J.A.S.; DE CASTRO, B.F., 2008).

14

15

16

1 **Figura 7:** Atuação da melatonina em ações celulares e sistêmicos.



2
3 **Fonte:** Adaptado de Reiter *et al.* (2020).

4
5 A síntese da Melatonina em humanos ocorre na glândula pineal
6 exclusivamente à noite, na ausência de luz; porém, outros órgãos como fígado, são
7 capazes de produzir Melatonina, mas somente para ação local (efeito parácrino e
8 autócrino). Estudos mostraram que a maior produção ocorre na infância, decresce
9 gradativamente a partir da puberdade, e permanece com uma diminuição
10 progressiva no envelhecimento, devido a calcificação da glândula pineal
11 (MAGANHIN, C.C; CARBONEI, A.A.F; HATTY, J.H et al, 2008).

12 A síntese de Melatonina acontece a partir do aminoácido triptofano,
13 e tem sua secreção regulada pelo núcleo supraquiasmático (SCN) no hipotálamo
14 (ESPOSITO, S.; et al., 2019). A metabolização no fígado ocorre através da enzima
15 microssomal P450 é a principal enzima metabolismo da melatonina em animais,
16 que causa hidroxilação em 6-hidroxi melatonina, seguida de conjugação com ácido
17 sulfúrico (90%) ou ácido glicurônico (10%); a excreção se dá através da urina
18 (CHOJNACKI et al, 2014). Processo não enzimático do metabolismo da melatonina
19 é mediado por sua interação com ROS e NO durante estresse oxidativo (TAN et
20 al., 2015).

21 Desde a sua descoberta, diversos estudos têm demonstrado as
22 propriedades biológicas da Melatonina incluindo imunomodulação, efeitos anti-

1 inflamatórios, antitumorais, antioxidantes (KASECKER, F.G.; NUNES, C.P, 2017).
2 Contudo, a literatura sugere que a Melatonina pode atuar de maneira antioxidante
3 ou pró-oxidante (IDELCHIK, M.D.P.S. et al, 2017; LIGUORI, I., et al, 2018; SU, S.C,
4 et al, 2017). Em células e tecidos normais, a Melatonina atua como antioxidante de
5 forma protetora, induzindo enzimas ou ativando o fator nuclear derivado de eritróide
6 2 (Nrf2), levando a supressão do estresse oxidativo por meio de eliminação direta
7 de ERO. Além disso é capaz de manter a homeostase redox em células saudáveis
8 (ARNAO, M.B; HERNANDEZ-RUIZ, J., 2021; HARDELAND, R., 2016). Já em
9 células tumorais, a Melatonina pode atuar como pró-oxidante induzindo um aumento
10 do estresse oxidativo (FERNANDEZ-PALACA, P.C et al, 2021) estando associado
11 com processos de mitofagia, apoptose, angiogênese, proliferação, migração,
12 invasão e imunorregulação de ambientes tumorais, a melatonina também é um
13 importante regulador do *status* redox de células tumorais (MORTEZAEI, 2018;
14 MORTEZAEI; KHANLARKHANI, 2018). Alguns dos efeitos biológicos da Melatonina
15 ocorrem através das ligações aos seus receptores específicos de membrana: MT1 e
16 MT2 (SLOMINSKI, R.M, et al, 2012). Por exemplo, a interação da melatonina com o
17 receptor MT1 está envolvida no bloqueio da liberação do citocromo c da mitocôndria,
18 o que normalmente leva à apoptose celular (PANG, Y.W, et al, 2016; GELALETI,
19 GB., et al, 2017).

20 O tratamento com baixas doses (0,1 - 10 μ M) de Melatonina em
21 células HepG2 durante 24h, causou aumento da viabilidade celular o que foi
22 associado ao aumento do conteúdo de GSH e, esse efeito não foi observado após
23 96h de incubação. Já o tratamento com altas doses de Melatonina (1000-10.000
24 μ M) causou uma redução drástica do conteúdo de GSH bem como elevou as ERO
25 (OSSENI *ET AL.*, 2000). Bennukul *et al.* (2014) mostraram que o tratamento com
26 1000 μ M de melatonina, por 24h, aumentou a morte celular de HepG2 induzida por
27 cisplatina sendo, uma possível explicação a redução de ERO.

28 É evidenciado que a melatonina é capaz de aumentar o produto da
29 peroxidação lipídica com uma diminuição significativa nos teores de GSH e
30 atividade de SOD em células HepG2, sugerindo o efeito pró-oxidante (AMMAR, O.A
31 et al, 2022). Achados semelhantes em HepG2 são descritos por Osseni et al.,
32 (2000), que demonstraram que a melatonina pode ter um efeito pró-oxidante,
33 dependendo de sua concentração e da duração da incubação em células de

1 hepatocarcinoma, reduzindo níveis de GSH e aumentos ROS.

2 Agindo como um pró-oxidante no CHC, a exposição de 1mM de
3 Melatonina de células HepG2 induz uma queda na porcentagem de células na fase
4 G0/G1 e um aumento de células na fase S, confirmando o efeito antiproliferativo da
5 melatonina (Fan L.-L., et al, 2010). Em um estudo mais extenso, a administração
6 *in vitro* de melatonina (0,1–10 mM por 10 dias) causou redução dependente da dose
7 e do tempo da viabilidade das células do CHC humano HepG2, esses resultados
8 foram associados a modificações na cinética do ciclo celular, com aumento da
9 porcentagem de células na fase G0/G1 acompanhada de redução na contagem de
10 células na fase G2/M; essas alterações foram relacionadas à indução da expressão
11 de p53 e subsequente ativação de p21 (um potente inibidor de quinases do ciclo
12 celular – CDKs), ainda demonstrou que é capaz de induzir apoptose tanto vias
13 extrínsecas quanto intrínsecas, com indução de atividade de caspase-8
14 independente de FasL, liberação citosólica de citocromo C da mitocôndria com
15 upregulation de Bax e indução da atividade da caspase-9 de maneira dose-
16 dependente e tempo-dependente (MARTÍN-RENEDO J., ET AL, 2008). Os
17 resultados foram confirmados por outros autores, não apenas em células HepG2,
18 mas também em células Hep3B de CHC, eles relataram uma redução da expressão
19 de ciclina D1 e a indução da parada do ciclo celular por 1 e 2 mM de melatonina
20 (MI L., KUANG H. 2020).

21 Além disso, melatonina pode atuar como terapia coadjuvante,
22 sensibilizando células à quimioterápicos convencionais (PRIETO-DOMINGUEZ *et*
23 *al.*, 2016). O tratamento de células HuH7 com melatonina (2,5mM) por 48h mostrou
24 efeito pró-apoptótico apenas quando associada à sorafenib (Lin *et al.*, 2017).
25 Contudo, células HepG2 tratadas com doses variando de 1nM até 1mM, por 24 e
26 48h apresentaram marcadores pró-apoptóticos elevados (MARTIN-RENEDO *et al.*,
27 2008; FAN *et al.*, 2013). Outro estudo realizado por FERNANDEZ-PALACA, P.C et
28 al, (2021) demonstrou que a coadministração de melatonina (1 e 2mM) com
29 sorafenibe (2,5 mM) em células Hep3B derivadas do CHC, produziu maior acúmulo
30 de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias. Além disso, esse efeito
31 induziu a despolarização da membrana mitocondrial e subsequente ativação da
32 morte celular por mitofagia.

33

1 4. JUSTIFICATIVA

2 Apesar dos avanços terapêuticos, as drogas utilizadas para o tratamento de
3 CHC são citotóxicas, apresentando elevado risco de efeitos colaterais (como
4 fadiga, hematomas ou hemorragias, infecções, perda de cabelo, náuseas e
5 vômitos, entre outros) e podem não mais agir adequadamente devido à resistência
6 adquirida contra quimioterápicos (MORTEZAE, 2018). Tratamentos alternativos,
7 portanto, são de fundamental investigação, assim como é relevante o estudo de
8 diferentes linhagens celulares de CHC. Na literatura não encontramos trabalhos
9 suficiente que avaliaram o perfil oxidativo, a atividade de enzimas antioxidantes e a
10 integridade de organelas em linhagem Huh7.5 após o tratamento com melatonina,
11 justificando assim a execução deste estudo.

12

13 5. OBJETIVOS

14 5.1 OBJETIVO GERAL

- 15 ➤ Investigar a ação da melatonina, após 24 e 48 h de tratamento *in vitro*, sobre a
16 linhagem tumoral humana de carcinoma hepatocelular (CHC), HuH7.5.

17

18 5.2 Objetivos Específicos

- 19 ➤ Avaliar o efeito citotóxico da Melatonina e viabilidade metabólica da linhagem
20 celular tumoral HuH7.5.
- 21 ➤ Analisar se o tratamento com Melatonina altera os níveis de espécies reativas
22 de oxigênio, óxido nítrico e ânion superóxido nessas células;
- 23 ➤ Mensurar parâmetros antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase
24 (CAT), glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG), glutathione
25 transferase (GT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),
26 glutathione-S-transferase (GST) em células Huh7.5 tratadas com melatonina.
- 27 ➤ Avaliar os mecanismos de ação relacionados a Melatonina, como potencial de
28 membrana mitocondrial, formação de corpos lipídicos e vacúolos autofágicos
29 nas células tratadas;
- 30 ➤ Analisar a distribuição do ciclo celular e indução de morte nas células após o
31 tratamento com Melatonina;

32

33

1 **6.PRODUÇÃO CIENTIFICA**

2

3 **6.1 Artigo:** Tratamento com Melatonina Aumenta o Estresse Oxidativo, Previne
4 a Progressão do Ciclo Celular, Causa Alterações Morfológicas e Induz Apoptose
5 de Células de Carcinoma Hepatocelular Humano

6

7

8 **A ser submetido à revista:** Antioxidants

9 **Fator de Impacto:** 7.675

10 **ISSN:** 2076-3921

11

1 *Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)*

2 **Melatonin Treatment Increase Oxidative Stress,**
3 **Prevents Cell Cycle Progression, Causes**
4 **Morphological Alterations and Induces Apoptosis of**
5 **Human Hepatocellular Carcinoma Cells**

6 Juliana M.B. de Morais-Valentim¹, Virgínia M. Concato¹, Ellen M. S. Cruz¹, Yasmin M. Santos
7 ¹, Débora H. Quadreli³; Fabrício, S. R. Inoue¹; Milena C. de Souza², Glaura S. A. Fernandes³,
8 Danielle, L. Bidóia⁴, Rayanne R. B. Machado⁴, Luiz Gustavo A. Chuffa⁵, Wander R. Pavanelli¹,
9 Fábio R. F. Seiva^{2*}

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors.
Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1
2
3

- ¹ Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer, State University of Londrina, PR, Brazil.
² Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Biological Science Center, Bandeirantes, PR, Brazil.
³ General Biology Department, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
⁴ Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Universidade Estadual de Maringá (UEM)
⁵ Department of Structural and Functional Biology, Paulista State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil.
 * Author to whom correspondence should be addressed.

Correspondence:

Fábio Rodrigues Ferreira Seiva (Fabio R. F. S.). Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Campus Luiz Meneghel, BR-369, KM 54, Bandeirantes 86360-000, PR, Brazil. E-mail address: fabio.seiva@uenp.edu.br

Abstract: Because of its highly aggressive nature and late diagnosis, hepatocellular carcinoma (HCC) does not respond effectively to available chemotherapeutic agents. Therefore, there is a relentless search for an ideal compound with low cost and antiproliferative potential that selectively targets liver tumor cells. This study evaluated the direct and indirect action of melatonin on the human HCC cell line HuH 7.5. The tumor cells were treated with 2.0 and 4.0 mM of Melatonin for 24 and 48 h. The parameters of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, formation of lipid bodies and autophagic vacuoles, cell cycle progression, cell death rate and ultrastructural alterations were evaluated. The treatment with melatonin caused pro-oxidant effects, increasing oxidative stress markers associated with the reduction of antioxidant enzymes in HuH 7.5 cells. In addition, melatonin caused damage to the mitochondrial membrane, increased lipid bodies and autophagic vacuoles. The treatment triggered G1 phase cell cycle arrest and induced cell death by apoptosis. Our results indicate that melatonin has pro-oxidant action in HuH 7.5 tumor cell showing inhibition of cell progression, induction of oxidative and metabolic stress, as well as cell cycle arrest leading to cell death.

Keywords: Liver Cancer, Melatonin, Pro-oxidant, HuH 7.5 cell

1. Introduction

Physiologically our tissues are exposed to highly reactive species (HRS) that are intermittently produced as a result of cellular respiration. Defects in mitochondrial or intermediate metabolism can elevate the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), culminating in oxidative stress (OS). Thanks to the wisdom of evolution, our cells are equipped with defense systems that counteract the excessive and damaging production of these radical and non-radical species. Among the main antioxidant defense mechanisms are the enzymes superoxide dismutase, catalase, and the glutathione system [1]. These protective agents are of vital relevance, as excessive ROS and RNS affect cellular components and can alter membrane permeability, inducing apoptosis, necroptosis, and the autophagic cellular response [2].

The background role of HRS and OS in the pathogenesis of various diseases is long known, and the association between OS and cancer has been sufficiently demonstrated [1, 3, 4]. Excessive and sustained OS can disrupt genetic/epigenetic events that facilitate the tumorigenesis process [5]. Paradoxically, increasing ROS and RNS

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

1 generation is a commonly employed strategy for inducing tumor cell
2 death. These apparently contradictory effects can be explained by the
3 level of HRS, as moderated/controlled levels of ROS lead to
4 inflammation and DNA mutation that are necessary to initiate
5 cancerous events [6, 7].

6 Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary tumor of the liver
7 resulting from the neoplastic proliferation of hepatocytes, the main
8 type of liver cell. HCC is usually correlated with pre-existing liver
9 diseases, such as cirrhosis, viral hepatitis B or C, alcoholic and
10 nonalcoholic hepatic steatosis, which over time may progress to HCC.
11 Generally, the diagnosis of HCC is based on non-invasive criteria, and
12 it is not uncommon the diagnose to occur in advanced stages of the
13 disease, which makes the mortality rates for HCC still quite high [8].
14 Despite the remarkable advances in HCC management, the actual
15 therapeutic agents present a slow response, serious adverse reactions,
16 and drug resistance can occur, limiting the treatment efficacy [9]. In
17 this context, further studies to improve therapeutic strategies are
18 mandatory.

19 Melatonin is a tryptophan-derived indolamine produced by the
20 pineal gland and several other organs [10]. Robust evidences reported
21 that melatonin restrains cancer development and growth, and
22 improves the outcomes of oncology patients [11-14]. In addition to its
23 ability to interfere with oxidant/antioxidant status, melatonin
24 possesses antiproliferative effects, halts cell cycle progression, limits
25 angiogenesis and metastasis events, and promotes cell death [15-17].
26 However, dose, time, cell type, and different regulatory mechanisms
27 are determining factors in explaining the role of melatonin and in
28 achieving the desired therapeutic effects [10]. Pharmacological doses
29 of melatonin are found to be more efficient than the physiological ones,
30 as tumor cells may have a limited-melatonin production [18]. In
31 addition, nanosized materials have emerged as promising alternatives
32 for melatonin administration [12].

33 The study of different and specific HCC cell lines is mandatory to
34 better understand the biology, the processes, and responses of the
35 injured tissue, since protein and cell heterogeneity is a recurrent
36 feature found in patients with HCC [19]. In a systematic review,
37 several studies were listed that evaluated the beneficial effects of
38 melatonin treatment alone or in combination [20]; the studies used
39 distinct cell lines and animal models. Of 34 in vitro studies, only 7 used
40 HuH 7.5, thus a more detailed investigation of this lineage will
41 contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the
42 treatment with melatonin. Therefore, this study aimed to evaluate the
43 parameters of oxidative stress, antioxidant enzyme activity, as well as
44 the integrity of organelles and the progression of HuH 7.5 cycle cells
45 after treatment with melatonin.

46 **2. Materials and Methods**

47 **2.1 Cell Culture and Melatonin**

48 We used the HuH 7.5 tumor line, derived from the HuH 7 lineage,
49 as we found no study evaluating melatonin's effects on this subtype.
50 A RPMI medium (Life technologies, Carlsbad, CA, USA),
51 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen,

1 New York, USA), 100 U/ml Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin
2 (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) was used and kept at 37
3 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Melatonin, ≥98% purity,
4 was obtained from Sigma-Aldrich. The melatonin stock solution was
5 dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Invitrogen, USA). We
6 tested two doses of melatonin, 2.0 and 4.0 mM, for two periods, 24 and
7 48 h.

8 9 10 11 **2.2 Evaluation of cytotoxicity by trypan blue exclusion**

12 HuH 7.5 cells (1x10⁵) were seeded and treated with melatonin in
13 24-well plates. Then, the cell suspension was diluted in 0.4% trypan
14 blue solution at a 1:1 ratio. The counting of the total number of viable
15 and non-viable cells was performed by light microscopy using a
16 Neubauer camera (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo,
17 Japan). The supernatant of this assay was stored at -80°C for
18 quantification of nitric oxide (NO).

19 20 **2.3 Determination of the Mitochondrial Membrane Potential** 21 **($\Delta\Psi_m$)**

22 To analyze the $\Delta\Psi_m$ after melatonin treatment, 25 nM of
23 tetramethylrodamine ethyl ester (TMRE) (Sigma-Aldrich) was
24 incubated with 1x10⁴ cells for 30 min at 37 °C. The reading was
25 performed at 480 nm excitation and 580nm emission in a fluorescence
26 microplate reader.

27 28 **2.4 Lipid Droplet and Autophagic Vacuole Detection**

29 After melatonin treatment, cells were labelled with Nile Red (10
30 µg/mL) (Sigma -Aldrich) for 30 min and analyzed on the fluorimeter
31 at 530 and 635 nm excitation and emission, respectively. To determine
32 autophagic vacuole formation, cells were incubated with
33 monodansylcadaverine (MDC) (50 µM) (Sigma Aldrich) for 1 h. Data
34 were obtained using a microplate fluorescence reader, at 380 nm
35 excitation and 525 nm emission.

36 37 **2.5 Cell death assay and cellular cycle analysis**

38 To ascertain the ability of melatonin to cause cell death, cell
39 suspension was washed with PBS and subsequently added 50 µL of
40 Annexin V and PI solution (Millipore, Billerica, USA) for 20 min at
41 room temperature to determine apoptosis and membrane disruption,
42 respectively. Samples were analyzed using BD Accuri TM C6 Plus
43 Flow Cytometer (BD Biosciences) and results were analyzed using
44 FlowJo software (BD Accuri). To evaluate whether melatonin can
45 interfere with the cell cycle, HuH 7.5 cells were seeded at a density of
46 1x10⁶ in 6-well plates. After treatment with melatonin, the cell
47 suspension was subjected to centrifugation at 1500 rpm for 5 min and
48 the cell pellet was resuspended in 300 µL PBS. Subsequently, a solution
49 containing 0.05% ribonuclease A (RNAse A) (Sigma-Aldrich) was
50 added and incubated for 30 min at 37 °C. Subsequently, a solution of

1 0.1% sodium citrate and 1% Triton-X100 was added with 50 µg/mL
2 propidium iodide (PI) (Sigma- Aldrich) for 30 min. Fluorescence was
3 estimated using Muse Cell Analyzer (Merck Millipore), with 5000
4 events. DNA was analyzed and the percentage of cells in different
5 cycle phases (G1, S and G2/M) was estimated according to fluorescence
6 intensity.

7 8 **2.6 Total Reactive Oxygen Species (ROS)**

9 1x10⁴ HuH 7.5 cells were treated with melatonin, and after
10 incubation, cells were washed with PBS and a solution of 2',7'-
11 dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) (10 µM) (Sigma Aldrich)
12 was added for 30 min in the dark at 37 °C. The reading was performed
13 on a spectrophotometer with excitation at 488 nm and emission at 530
14 nm.

15 16 **2.7 Nitric oxide (NO) and Superoxide anion (O₂⁻) formation**

17 The quantification of nitric oxide (NO) production was
18 determined by the Griess method [21]. A 60 µL aliquot of the
19 supernatant described in 2.2 was added to a 96-well plate and then 60
20 µL of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1%
21 naphthylethylenediamine hydrochloride in 5% H₃PO₄). The
22 calibration curve was prepared using serial dilutions of NaNO₂. The
23 samples were incubated at room temperature for 10 min and the
24 absorbance was read at 550 nm with a microplate reader (Thermo
25 Scientific, Multiskan GO). For the evaluation of O₂⁻ production, 1
26 mg/mL of nitro blue tetrazolium solution (NBT, Sigma Aldrich) was
27 used. Briefly, soon after melatonin treatment, 100 µL of NBT was
28 added, at 37 °C for 2 h. The supernatant was removed and the
29 precipitated formazan was solubilized by adding 60 µL of KOH (2M)
30 and 60 µL of DMSO. The reading was performed at 600 nm in a
31 spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer,
32 Thermo Scientific).

33 34 **2.8 Measurement of Antioxidant Systems**

35 **2.8.1 Preparation of the supernatant**

36 After melatonin treatment, the culture medium was discarded
37 and PBS was added. Subsequently, these cells were lysed through
38 three cycles of freezing (-80 °C) and thawing (37 °C) for 30 min each.
39 After this process, protein levels were quantified and used to
40 normalize the results of the thiobarbituric acid reactive substances
41 (TBARS), total, reduced and oxidized glutathione (GT, GSH, GSSG),
42 catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and superoxide
43 dismutase (SOD) assays.

44 45 **2.8.2 Catalase activity (CAT)**

46 To evaluate the enzyme activity of CAT cells were lysed,
47 centrifuged with reaction medium as described by [22]. The reading
48 was performed by spectrophotometer at 240 nm for 1 mi at 15 second
49 intervals.

50

2.8.3 Measurement of GSH, GT, GSSG and determination of Oxidative Stress Index (OSI).

To quantify the levels of reduced glutathione (GSH) and total glutathione (GT) the protocol was carried out according to the method proposed by Rahman, et al. [23], with some modifications, using 5,5'-ditiobis 20-nitro benzoic acid (DTNB) in the homogenate, evidenced by yellow color formation. To determine the total glutathione (GT) levels, DTNB, nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and glutathione reductase were used in the homogenate. GT and GSH levels were measured at 412 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific), and results were expressed as micromoles/mg protein. GSSG levels and oxidative stress index (OSI) were calculated as described by Carrara, et al. [24], considering the stoichiometry of the reaction.

2.8.4 Glutathione s-transferase (GST)

To evaluate glutathione S-transferase activity, 1- chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and potassium phosphate buffer were used. The absorbance of the sample was measured at 340 nm for 160 seconds, with 5 measurements at 40 second intervals [25].

2.8.5 Quantification of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

In order to verify whether melatonin leads to lipid peroxidation, after HuH 7.5 cells treatment with melatonin, 50 μ L of sample was added to a TCA solution (10%) for protein precipitation. Subsequently, thiobarbituric acid (TBA 0.67%) was added to the samples, incubated for 15 min in a boiling water bath (100 °C), then transferred to an ice bath. Malondialdehyde (MDA) was then quantified as an indicator of lipid peroxidation in the samples by measuring the absorbance by spectrophotometry (572-535 nm) [26].

2.8.6 Superoxide dismutase (SOD) assay

The superoxide dismutase (SOD) assay was performed according to Marklund and Marklund [27] with some modifications. The reaction medium was composed of methionine (13 mM), NBT (75 μ M) and riboflavin (4 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.8). 10 μ L of the cell extract was added and the samples were exposed to fluorescent light (13W) for 5 min. Control samples (no enzymes) and the blank (containing all reagents but not exposed to light) were used. Readings were performed in MultiSkán-Skyhigh microplate reader at 560 nm and a temperature of 25°C.

2.9. Visualization of ultrastructural changes transmission electron microscopy (TEM)

To perform TEM, HuH 7.5 cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 60 min, post-fixed with 1% OsO₄, 0.8% potassium ferrocyanide and 10.0 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. After, samples were dehydrated in increased concentrations of acetone (30-100%) and

1 embedded in EPON™ epoxy resin. Ultrathin sections (60-70 nm) were
 2 obtained, mounted on copper grids and contrasted with uranyl acetate
 3 and lead citrate. Analysis was performed on JEOL JEM-1400.
 4

5 2.10 Statistical analysis

6 Statistical differences were obtained after analysis of variance
 7 (ANOVA), followed by Tukey's test for multiple comparisons using
 8 GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad Software, USA). Data
 9 were expressed as mean \pm SEM and were considered significant
 10 differences when p value < 0.05 . Values were also categorized by: * (p
 11 < 0.05); ** (p ≤ 0.01); *** (p ≤ 0.001); **** (p ≤ 0.0001).

12 3. Results

13 3.1 Antiproliferative effect on HuH 7.5 cells treated with Melatonin

14 Initially, to investigate the cytotoxic effect of melatonin on HuH
 15 7.5 cells, a pilot MTT assay was performed, and the concentrations of
 16 2.0 and 4.0 mM of melatonin were effective in inhibiting cell viability
 17 (data not showed). To complement and confirm those results, we
 18 quantified the number of viable cells by applying the trypan blue
 19 exclusion method. After 24 h of treatment with melatonin, we
 20 observed that in both concentrations there was a reduction in cell
 21 viability (72.06% and 43.79%) in relation to the control group (p \leq
 22 0.0001). At 48 h, there was a more pronounced reduction, remaining
 23 59.70% and 43.60% of viable cells compared with the control group
 24 (p ≤ 0.0001) (Table 1).
 25
 26

27 **Table 1:** Trypan blue counts after 24h and 48h of treatment with melatonin. Control
 28 (cells with RPMI medium), and melatonin (2.0 and 4.0 mM). Values (%) represent
 29 the mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate.

Period	Groups			p value
	Control	2mM	4mM	
24h	106,25 \pm 2,59	72,06 \pm 4,38	43,79 \pm 4,84	<0,0001
48h	95,42 \pm 1,47	59,70 \pm 3,14	43,60 \pm 1,42	<0,0001

30 3.2 Melatonin treatment increased oxidative stress in HuH 7.5 cells

31 A significant augment in intracellular ROS levels was observed
 32 with 2.0 and 4.0 mM concentrations of melatonin (Fig. 1A).
 33 Accordingly, melatonin treatment also elevated the levels of pro-
 34 oxidant molecules such as MDA (Fig. 1B), NO (Fig. 1C), and O₂⁻ (Fig.
 35 1D), compared with the control group.

36 Notably, HuH 7.5 cells treated with melatonin had a reduction in
 37 the activities of antioxidant enzymes such as SOD (Fig. 1E) and CAT
 38 (Fig. 1F). A statistically significant decrease in GSH levels was
 39 observed at 24 h with the concentrations of 2.0 and 4.0 mM of
 40
 41
 42
 43
 44

melatonin (Fig. 1G). The levels of GSSG were increased only at 48h with 4.0 mM of melatonin (Fig. 1H), and total glutathione was higher after 48 h of melatonin's treatment (Fig. 1J). GST activity was reduced after the treatment with melatonin (Fig. 1I). These results are consistent with the elevated stress index observed in cells that received the melatonin treatment (Fig. 1K). This set of data suggests that melatonin acts in a pro-oxidant manner in HuH 7.5 cells.

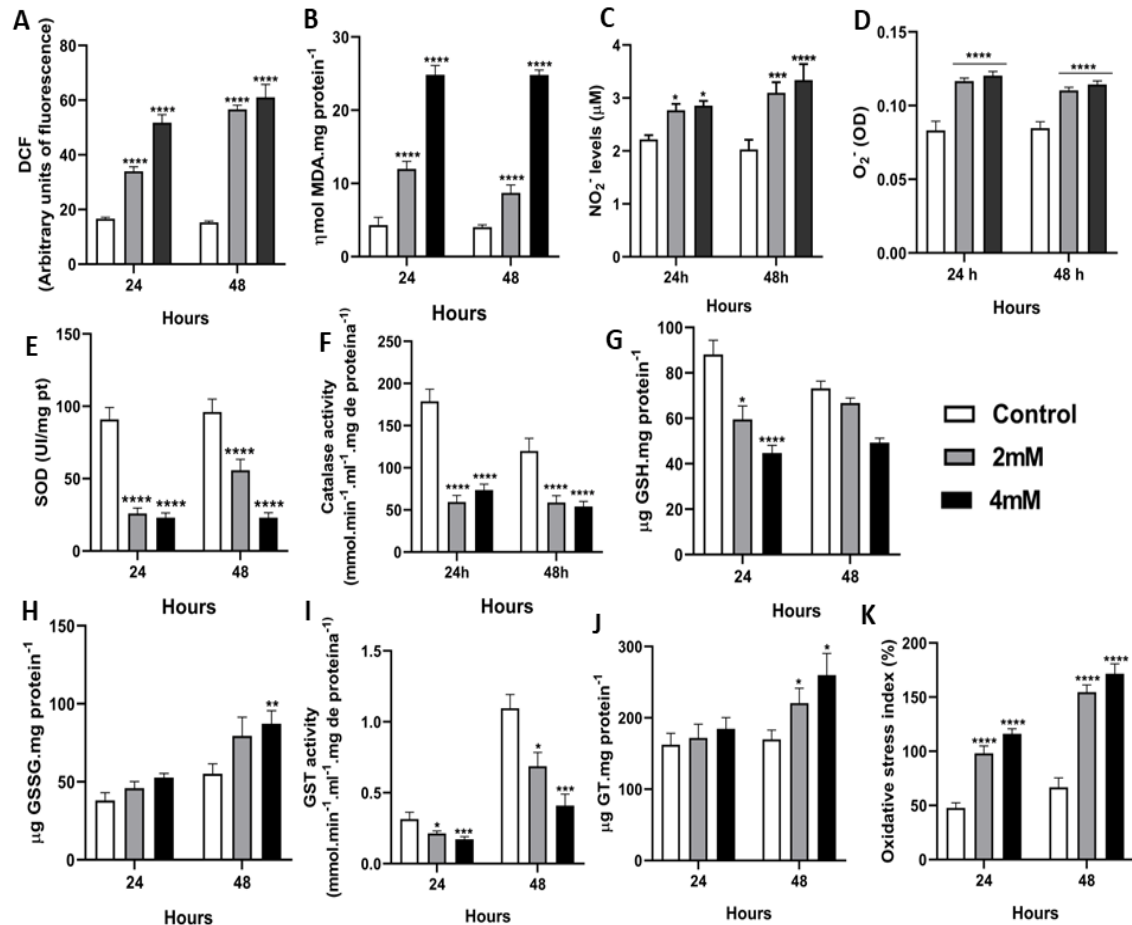


Figure 1. Melatonin-induced cellular oxidative stress in HuH 7.5 cells. (A) Determination of total ROS by a fluorescent probe. (B) Production of lipid peroxidation by MDA (C) Griess method for evaluation of nitric oxide levels (D) Production of superoxide anion by NBT. (E) Quantification of superoxide dismutase (SOD). (F) Quantification of Catalase by peroxide dismutation. (G) Determination of GSH by DTNB. (H) Calculation of GSSG levels. (I) Determination of GST activity by CDNB. (J) Determination of GT by DTNB and NADPH. (K) Oxidative stress index. Values represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in triplicate. Significant difference * ($p \leq 0.05$); *** ($p \leq 0.001$); **** ($p \leq 0.0001$) compared to control.

3.3 Mitochondria membrane integrity, lipid bodies and autophagic vacuole formation were affected by melatonin

To determine whether significantly higher levels of ROS correlated with mitochondrial alterations, we investigated the mitochondrial membrane potential by assessing the integrity of mitochondrial functioning through TMRE staining. Alterations in the

1
2
3
4
5
6
7
8

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

$\Delta\Psi_m$ is intrinsically associated with mitochondrial dysfunction and cell death. After 24 and 48 h of melatonin treatment, there was a reduction in the intensity of the TMRE fluorescence in HuH 7.5 cells with the two concentrations compared with the control group ($p \leq 0.0001$), indicating the occurrence of loss of mitochondrial membrane potential (Fig. 2A).

The formation of lipid bodies was verified after 24h of treatment and more evident formation occurred after 48 h ($p \leq 0.0001$) (Fig. 2B). It was also possible to identify by MDC staining that after 24 and 48 h of treatment with melatonin, in both concentrations, there was an increase in autophagic vacuoles when compared with the control group ($p \leq 0.0001$) (Fig. 2C). Together, these data allow us to suggest that melatonin treatment induced cellular metabolic stress, in the HuH 7.5 tumor cells.

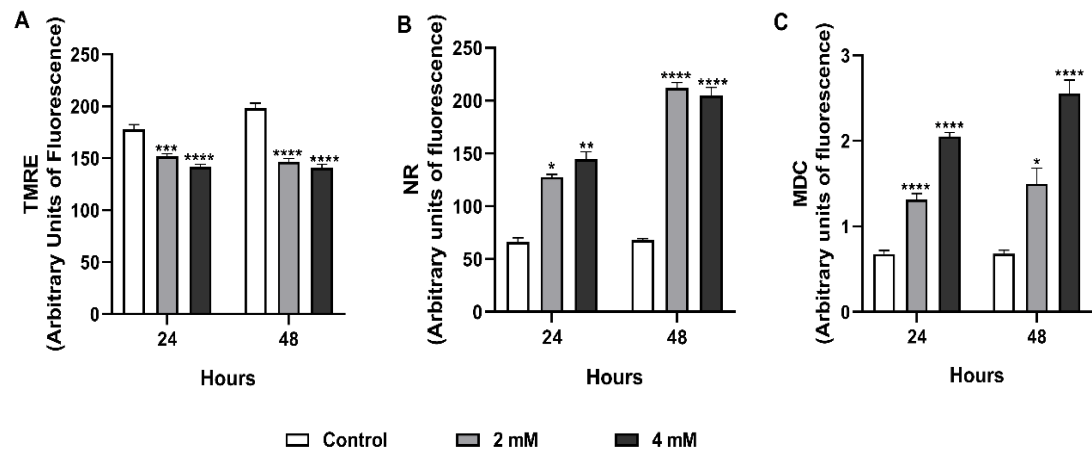


Figure 2: Melatonin induces metabolic stress in HuH 7.5 cells. Cells treated with Melatonin (2 and 4mM) for 24 and 48h. (A) Assessment of mitochondrial membrane integrity by TMRE assay. (B) Labelling of lipid droplets by Nile red. (C) Quantification of autophagic vacuoles by MDC. Values represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in triplicate. Significant difference * ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.001$); **** ($p \leq 0.0001$) vs. control.

3.4 Melatonin induced cell cycle arrest in G0/G1 phase in HuH 7.5 cells.

The treatment with melatonin altered the percentage of cells in different phases of the cell cycle. After 24 h of treatment, an increase in the percentage of HuH 7.5 cells was observed in the G1 phases ($p \leq 0.01$) and a reduced percentage in S ($p \leq 0.05$) and G2/M ($p \leq 0.01$) phases, when compared with the control group (Fig. 3A and 3B). After 48 h these results became more evident (Fig. 3C and 3D). Melatonin induces cell cycle arrest in G1 phase, consequently halting the progression of cell division. Furthermore, at 48 h with 4.0 mM of melatonin we showed cells in the SubG0 phase, an indication that death by apoptosis may be occurring (Fig. 3D).

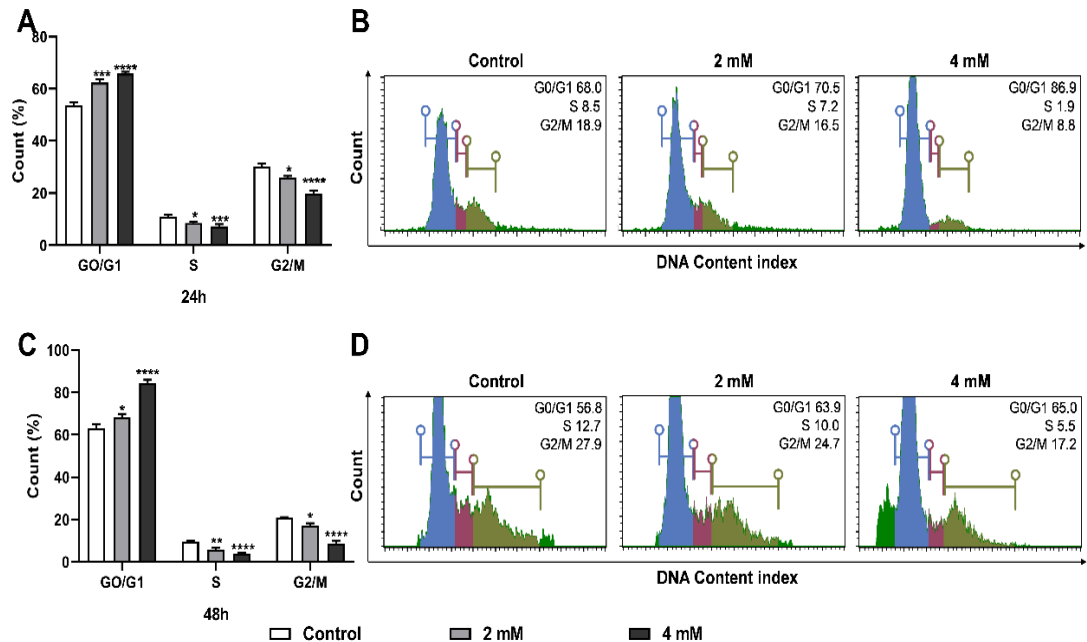
1
2
3
4

Figure 3. Melatonin induces cell cycle arrest in G0/G1 phase in HuH 7.5 cells. Cells were treated with concentrations (2Mm and 4Mm) of Melatonin for 24 (A) and 48 h (C), and cell cycle distribution performed by flow cytometry. Quantitative analysis of cells in different phases of the cell cycle were evaluated at 24 (B) and 48 h (D). Values represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in triplicate. Significant difference * ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.001$); **** ($p \leq 0.0001$). vs. the control.

3.5 Melatonin triggered HuH 7.5 cell death by apoptosis

To ensure that HuH 7.5 cell death was associated with apoptotic events rather than necrosis, we performed Annexin V and Propidium Iodide (PI) labelling. Melatonin treatment increased apoptosis at 48 h in both concentrations ($p \leq 0.0001$), in addition to the process of late apoptosis at both periods and concentrations tested (Fig. 4). There was no significant difference when necrosis was assessed. Therefore, the data show that melatonin triggers death by apoptosis.

3.6 Transmission electron microscopy images confirmed structural and metabolic alterations in Huh 7.5 cell treated with melatonin.

TEM showed control cells with normal mitochondria, exhibiting regular appearance with distribution of thin and parallel oriented cristae. Endoplasmic reticulum was also seen in close contact with mitochondria in all conditions. Melatonin-treated cells after 24 and 48 h presented an increased number of mitochondria with a disorganized and heterogeneous distribution of cristae. In addition, the presence of autophagic vacuoles and lipid droplets have been observed in cells treated with melatonin (Fig. 5).

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

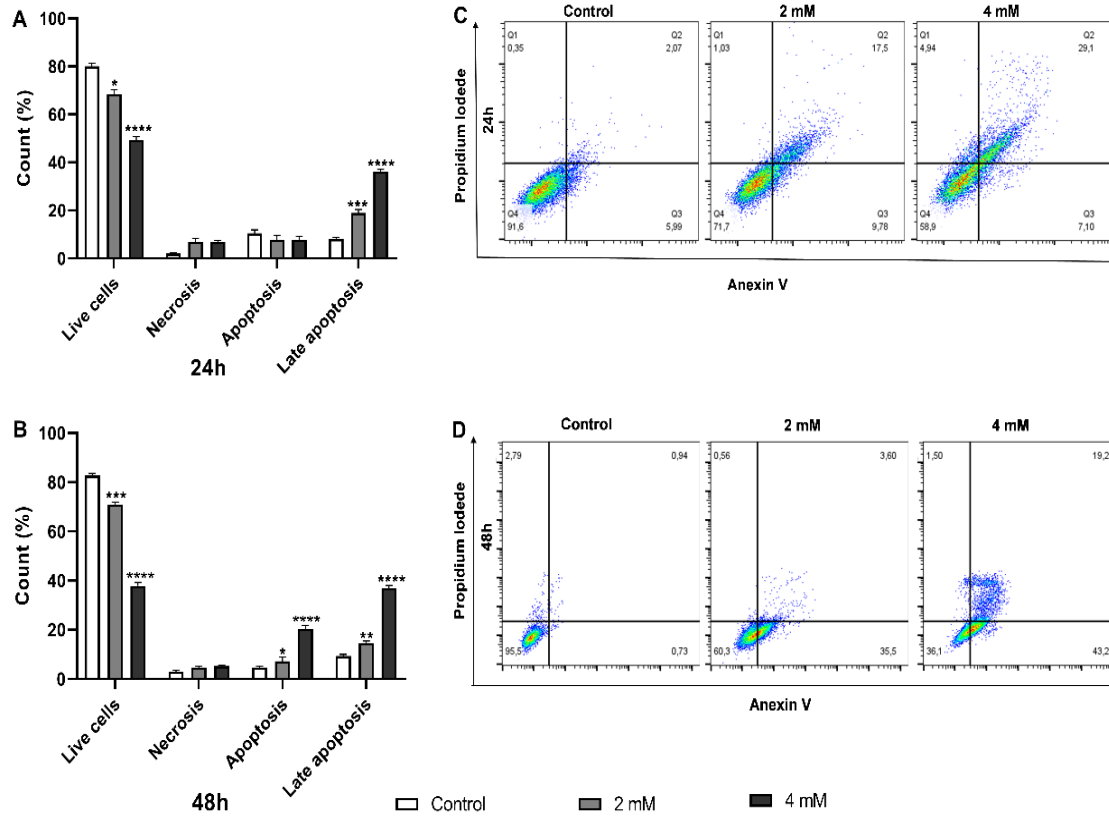


Figure 4: Cell death in HuH 7.5 cells by apoptosis caused by Melatonin. HuH 7.5 cells treated for 24 and 48 h with Melatonin (2 E 4mM). (A) Bar graph of the analysis of Annexin V and propidium iodide labelling at 24 h. (B) Bar graph of analysis of Annexin V and propidium iodide labelling at 48 h. (C) Representative histogram of the analysis. Values represent the mean ± SEM of three different experiments performed in triplicate. Significant difference * (p≤0.05); ** (p≤0.01); *** (p≤0.001); **** (p≤0.0001). vs. control.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

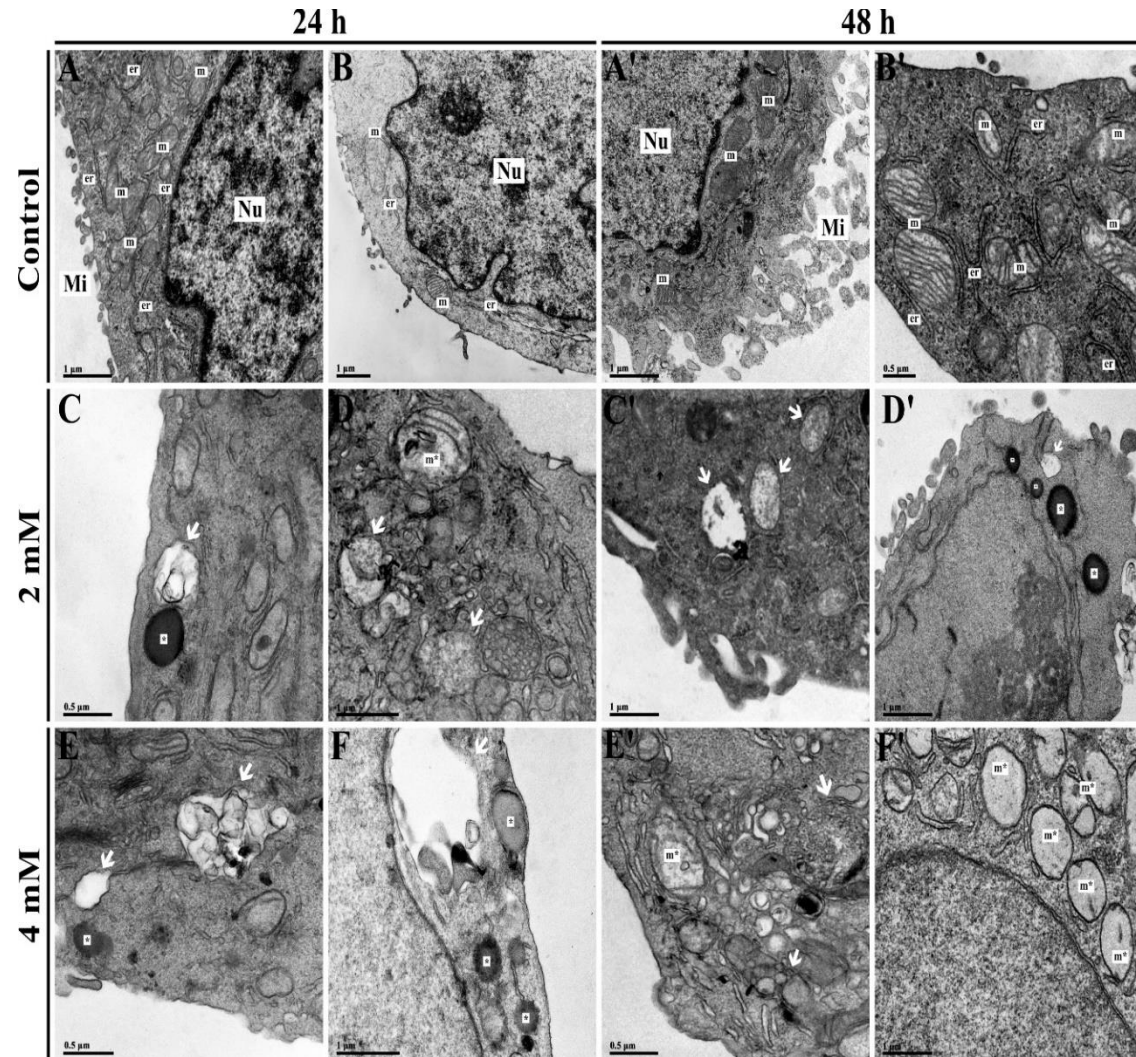


Figure 5. Structural alterations in HuH7.5 cells treated with 2 mM and 4 mM melatonin for 24 h and 48 h. (A-B) Untreated HuH7.5 cells (24 h control); (A'-B') Untreated HuH7.5 cells (48 h control); (C-D) HuH7.5 treated with 2 mM melatonin for 24 h; (C'-D') HuH7.5 treated with 2 mM melatonin for 48 h; (E,F) HuH7.5 treated with 4 mM melatonin for 24 h; (E',F') HuH7.5 treated with 4 mM melatonin for 48 h. Endoplasmic reticulum (er); Mitochondria (m); Microvilli (Mi); Nucleus (Nu); Disorganized mitochondria (m*); Lipid droplets (*); Autophagic vacuoles (arrows). Scale bars: 1 μm (A,B,A',C', D,D',F,F'); 0.5 μm (B',C,E,E').

4. Discussion

This study corroborated the potential antitumor properties of melatonin, indicating that this molecule may be instituted as a co-adjuvant option for the treatment of HCC. Melatonin led to a pro-oxidant intracellular environment, which may have caused cycle cell arrest and disturbance of metabolic processes. These alterations culminated in cell death by apoptosis.

OS plays a relevant role in the development and progression of HCC. HRS are unavoidable physiological byproducts of the respiratory electron transport chain (ETC) of mitochondria. OS, otherwise, can be a useful tool in combating tumor cells, as in excess,

1 these molecules induce oxidative damage to biomolecules, provoking
2 protein and lipid oxidation, and DNA damage [3]; as a defensive
3 strategy, tumor cells can increase their antioxidant arsenal, thus
4 avoiding OS. Although melatonin is an efficient antioxidant in healthy
5 cells and tissues, in tumor cells its effect seems to be the opposite [16,
6 28, 29]. Our results reinforce the pro-oxidant properties of melatonin
7 in the HuH 7.5 cells. Melatonin treatment caused
8 accumulation/increase in the levels of OS biomarkers, such as MDA,
9 NO and O₂⁻, which may be associated with the lower antioxidant
10 capacity of tumor cells. Lower SOD and catalase activities and
11 increased ROS levels were demonstrated in human colorectal cancer
12 cells and in the HCC cells, HepG2, after melatonin treatment [28, 30].
13 We confirmed the increased lipid peroxidation and the excessive ROS
14 generation caused by melatonin.

15 NO, as a physiological messenger, possess pro-tumorigenic
16 properties modulating tumor growth and progression. Conversely,
17 elevated RNS, through nitrosative stress signaling, exerts antitumoral
18 effects in HCC cell line [31]. We showed that the exacerbation of NO
19 production resulting from melatonin is consistent with the indolamine
20 effect in increasing oxidative damage in these cells. Melatonin also
21 increased the levels of O₂⁻ compared with the control group. High
22 levels of superoxide anion are related to the activation of stress-
23 mediated signaling pathway and the induction of apoptosis through
24 the regulation of associated proteins [32]. Elevation of O₂⁻ can be
25 explained, at least in part, by the reduction of the SOD capacity to
26 efficiently dismutate the superoxide anions. CAT activity was also
27 reduced after melatonin treatments, suggesting that melatonin acts
28 directly as a modulator of these two antioxidant enzymes.

29 Glutathione system and sulfur-based intermediates play a central
30 role against OS. The glutathione in its reduced form (GSH) maintain a
31 reduced environment in subcellular compartments, such as the
32 mitochondria and cytosol. However, under OS condition, GSH can be
33 directly converted to glutathione disulfide (GSSG) by reacting with
34 ROS. Melatonin caused an imbalance between GSH and GSSG pools,
35 mainly at 48 h and with 4.0 mM concentration. The depletion of GSH
36 in HuH 7.5 cells caused by melatonin suggests that recovery of GSH
37 did not occur at a significant rate. Our findings confirm data from the
38 literature for HepG2 cancer cells treated with melatonin [28, 33]. We
39 also evidenced a significant reduction in GST activity after treatment
40 with melatonin at both concentrations and periods tested. Controlled
41 upregulation of the glutathione system contributes to the proliferation
42 of live cancer cells [34]. So far, we strongly suggest that the antitumoral
43 properties of melatonin are mediated by increased OS resulted from
44 decreased enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems.
45 Melatonin can regulate antioxidant defense systems both at activity
46 and enzymatic gene expression level [35], but to precisely determine
47 its role in the molecular pathways that regulate the activity and/or
48 expression of antioxidant enzyme genes, further studies are
49 warranted.

50 Augmented ROS levels followed melatonin treatment caused
51 membrane biological damage altering the mitochondrial membrane
52 potential. The maintenance of mitochondrial structure is a deterrent
53 factor for the cell fate and conditions in which the organelle is

1 damaged by excessive OS cause pro-apoptotic stimulus leading cell to
2 death [36]. The decrease in mitochondrial membrane potential in
3 addition to the TEM images confirmed that melatonin altered the
4 ultrastructure of the mitochondrial cristae. The impaired mitochondria
5 may have induced the cells to rely on lipid substrates as an energy
6 source, which explains the increased formation of lipid bodies found
7 in the treated cells. Otherwise, the induction of apoptosis caused by OS
8 provoked a rapid accumulation of lipid droplets in the cytosol, which
9 may be the result of β -oxidation of fatty acid inhibition [37].

10 The autophagic process involves cell recycling through the
11 formation of autophagic vacuoles; these events allow programmed
12 degradation of proteins and the renewal of organelles contributing to
13 the maintenance of cellular homeostasis. In the cancer scenario, the
14 autophagic response plays dual roles, as an inducer of oncogenesis and
15 as a tumor suppressor [38]. We hypothesized that the overactivation of
16 autophagy after melatonin treatment, as confirmed by the TEM
17 images, is an antitumoral response associated with apoptosis; further
18 studies are needed to confirm these findings. Anticancer drugs
19 commonly induce cancer cell death through activation of apoptosis
20 cascade [39]. We showed that the treatment with melatonin caused
21 HuH 7.5 cell death by apoptosis, which may be triggered by ROS
22 endogenous signals. It is well established that tumor development is
23 related not only to exacerbated undifferentiation and proliferation, but
24 also to the inability of cells to enter apoptosis [40]. From this
25 perspective, stimulation of pharmacologically-induced-apoptotic
26 processes is an essential feature of cancer therapy, and the ability of
27 melatonin to induce this type of death is an important strategy to
28 eliminate tumor cells.

29 Finally, we accessed tumor cell cycle progression after the
30 melatonin treatment. The events that regulate the four stages of the cell
31 cycle consist of a highly coordinated sequence of molecular steps that
32 allow cells to grow and replicate their genome; dysregulation of the
33 cell cycle is strongly associated with the development of abnormal cells
34 with high proliferative potential. The ability of melatonin to influence
35 cell cycle events has been demonstrated in different cell lines [41]. For
36 HCC cells, different results have been found; Long, et al. [42] showed
37 that melatonin arrested the cell cycle at the G0/G1 phase in Bel7402
38 cells, which was associated with the downregulation of Akt and c-myc
39 pathways. Conversely, melatonin treatment of HepG2 cell induced cell
40 cycle arrest in G2/M, and this effect was associated with the activation
41 of the JNK signaling cascade and the p53/ p21 system [43]. Our results
42 showed that the HuH 7.5 cell responded to melatonin' treatment
43 similarly to Bel7402 cells, as we observed a significant increase in the
44 number of cells arrested in the G1/G0 phases; but we demonstrated
45 that melatonin also reduced the number of HuH 7.5 cells in the S and
46 G2/M phases. Although these findings strongly support the need to
47 understand how melatonin acts in different HCC cell lineages, we
48 confirmed melatonin as a potential oncostatic agent. Authors should
49 discuss the results and how they can be interpreted from the
50 perspective of previous studies and of the working hypotheses. The
51 findings and their implications should be discussed in the broadest
52 context possible. Future research directions may also be highlighted.
53

5. Conclusions

This study demonstrated that melatonin treatment in cells of hepatocellular carcinoma cells, HuH 7.5, increased oxidative stress, prevented cell cycle progression, and drove tumor cells to death by apoptosis. If the reduction of the mitochondria membrane potential and the increasing lipid bodies and autophagic vacuoles are consequences or the causes of OS remains to be further elucidated. In any case, melatonin treatment was effective in halting cell cycle and triggering cell death by apoptosis, highlighting melatonin as a potent cytotoxic and antitumor agent in HuH 7.5 cells. In the case of tumor cells requiring high doses of melatonin for an effective response, the dose of 4.0 mM for a longer period (48 h) should be considered. Taking the dismal scenario for the curative treatment of patients with HCC, melatonin is an actual alternative to assist in drug therapy (Fig.6).

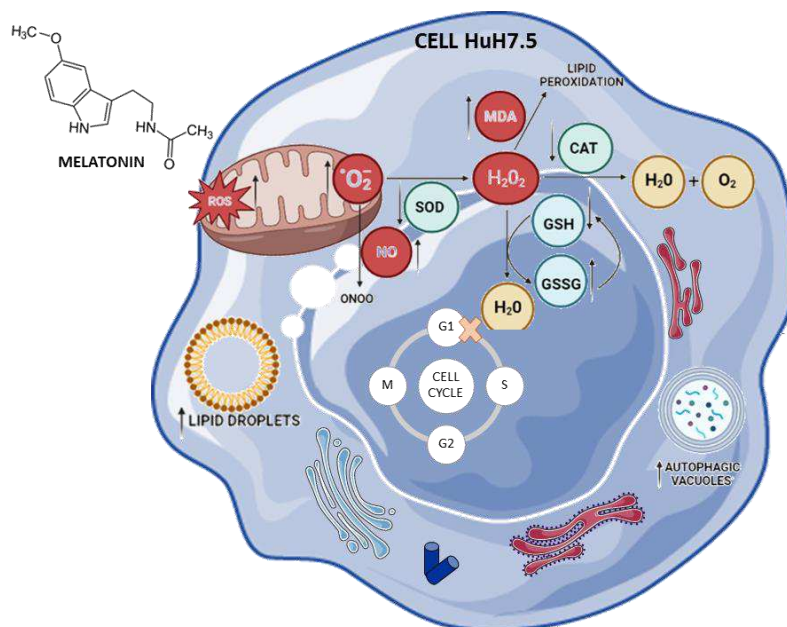


Figure 6: Summary of the main results obtained in Melatonin-treated HuH7.5 cells.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” Please turn to the [CRediT taxonomy](https://www.creditchat.org/) for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX” and “The APC was funded by XXX”. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>. Any errors may affect your future funding.

1 **Conflicts of Interest:** Declare conflicts of interest or state “The authors declare
2 no conflict of interest.” Authors must identify and declare any personal
3 circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing
4 the representation or interpretation of reported research results. Any role of
5 the funders in the design of the study; in the collection, analyses or
6 interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to
7 publish the results must be declared in this section. If there is no role, please
8 state “The funders had no role in the design of the study; in the collection,
9 analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the
10 decision to publish the results”.

11 **References**

- 12 [1] Taucher, E.; Mykoliuk, I.; Fediuk, M.; Smolle-Juettner, F. M. Autophagy, Oxidative Stress and Cancer
13 Development. *Cancers (Basel)* 2022, 14, DOI: 10.3390/cancers14071637.
- 14 [2] Tian, C.; Liu, Y.; Li, Z.; Zhu, P.; Zhao, M. Mitochondria Related Cell Death Modalities and Disease. *Front*
15 *Cell Dev Biol* 2022, 10, 832356, DOI: 10.3389/fcell.2022.832356.
- 16 [3] Jelic, M. D.; Mandic, A. D.; Maricic, S. M.; Srdjenovic, B. U. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer*
17 *Res Ther* 2021, 17, 22-28, DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16.
- 18 [4] Chuffa, L. G. d. A.; de Souza, M. C.; Cruz, E. M. S.; Ferreira, F. B.; de Moraes, J. M. B.; Seiva, F. R. F.
19 Hepatocellular carcinoma and miRNAs: An in silico approach revealing potential therapeutic targets for
20 polyphenols. *Phytomedicine Plus* 2022, 2, DOI: 10.1016/j.phyplu.2022.100259.
- 21 [5] Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. N.; Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer:
22 how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010, 49, 1603-1616, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- 23 [6] Pan, J. S.; Hong, M. Z.; Ren, J. L. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J*
24 *Gastroenterol* 2009, 15, 1702-1707, DOI: 10.3748/wjg.15.1702.
- 25 [7] Lin, S.; Li, Y.; Zamyatnin, A. A., Jr.; Werner, J.; Bazhin, A. V. Reactive oxygen species and colorectal cancer.
26 *J Cell Physiol* 2018, 233, 5119-5132, DOI: 10.1002/jcp.26356.
- 27 [8] Ganesan, P.; Kulik, L. M. Hepatocellular Carcinoma: New Developments. *Clin Liver Dis* 2023, 27, 85-102,
28 DOI: 10.1016/j.cld.2022.08.004.
- 29 [9] Nault, J. C.; Cheng, A. L.; Sangro, B.; Llovet, J. M. Milestones in the pathogenesis and management of
30 primary liver cancer. *J Hepatol* 2020, 72, 209-214, DOI: 10.1016/j.jhep.2019.11.006.
- 31 [10] Reiter, R. J.; Sharma, R.; Rosales-Corral, S.; Manucha, W.; Chuffa, L. G. A.; Zuccari, D. Melatonin and
32 Pathological Cell Interactions: Mitochondrial Glucose Processing in Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2021, 22, DOI:
33 10.3390/ijms222212494.
- 34 [11] Reiter, R. J.; Rosales-Corral, S. A.; Tan, D. X.; Acuna-Castroviejo, D.; Qin, L.; Yang, S. F.; Xu, K. Melatonin,
35 a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2017, 18,
36 DOI: 10.3390/ijms18040843.
- 37 [12] Chuffa, L. G.; Seiva, F. R. F.; Novais, A. A.; Simão, V. A.; Giménez, V. M. M.; Manucha, W.; Campos
38 Zuccari, D. A. P.; Reiter, R. J. Melatonin-Loaded Nanocarriers: New Horizons for Therapeutic Applications.
39 *Molecules* 2021, 26, 3562, DOI: 10.3390/molecules26123562.
- 40 [13] Chuffa, L. G. A.; Carvalho, R. F.; Justulin, L. A.; Cury, S. S.; Seiva, F. R. F.; Jardim-Perassi, B. V.; Zuccari,
41 D.; Reiter, R. J. A meta-analysis of microRNA networks regulated by melatonin in cancer: Portrait of potential
42 candidates for breast cancer treatment. *J Pineal Res* 2020, e12693, DOI: 10.1111/jpi.12693.

- 1 [14] Sadoughi, F.; Maleki Dana, P.; Homayoonfal, M.; Sharifi, M.; Asemi, Z. Molecular basis of melatonin
2 protective effects in metastasis: A novel target of melatonin. *Biochimie* 2022, 202, 15-25, DOI:
3 10.1016/j.biochi.2022.05.012.
- 4 [15] Tamtaji, O. R.; Mirhosseini, N.; Reiter, R. J.; Behnamfar, M.; Asemi, Z. Melatonin and pancreatic cancer:
5 Current knowledge and future perspectives. *J Cell Physiol* 2019, 234, 5372-5378, DOI: 10.1002/jcp.27372.
- 6 [16] Pourhanifeh, M. H.; Sharifi, M.; Reiter, R. J.; Davoodabadi, A.; Asemi, Z. Melatonin and non-small cell
7 lung cancer: new insights into signaling pathways. *Cancer Cell Int* 2019, 19, 131, DOI: 10.1186/s12935-019-0853-
8 7.
- 9 [17] Prieto-Dominguez, N.; Ordonez, R.; Fernandez, A.; Mendez-Blanco, C.; Baulies, A.; Garcia-Ruiz, C.;
10 Fernandez-Checa, J. C.; Mauriz, J. L.; Gonzalez-Gallego, J. Melatonin-induced increase in sensitivity of human
11 hepatocellular carcinoma cells to sorafenib is associated with reactive oxygen species production and
12 mitophagy. *J Pineal Res* 2016, 61, 396-407, DOI: 10.1111/jpi.12358.
- 13 [18] Cuciello, M. S.; Cesário, R. C.; Silveira, H. S.; Gaiotte, L. B.; dos Santos, S. A. A.; de Campos Zuccari, D. A.
14 P.; Seiva, F. R. F.; Reiter, R. J.; de Almeida Chuffa, L. G. Melatonin Reverses the Warburg-Type Metabolism and
15 Reduces Mitochondrial Membrane Potential of Ovarian Cancer Cells Independent of MT1 Receptor Activation.
16 *Molecules* 2022, 27, DOI: 10.3390/molecules27144350.
- 17 [19] Gu, Y.; Guo, Y.; Gao, N.; Fang, Y.; Xu, C.; Hu, G.; Guo, M.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Zhou, J., et al. The proteomic
18 characterization of the peritumor microenvironment in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2022, 41,
19 2480-2491, DOI: 10.1038/s41388-022-02264-3.
- 20 [20] Fernandez-Palanca, P.; Mendez-Blanco, C.; Fondevila, F.; Tunon, M. J.; Reiter, R. J.; Mauriz, J. L.; Gonzalez-
21 Gallego, J. Melatonin as an Antitumor Agent against Liver Cancer: An Updated Systematic Review.
22 *Antioxidants (Basel)* 2021, 10, DOI: 10.3390/antiox10010103.
- 23 [21] Sun, J.; Zhang, X.; Broderick, M.; Fein, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems
24 by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 2003, 3, 276-284, DOI: 10.3390/s30800276.
- 25 [22]
- 26 [23] Rahman, I.; Kode, A.; Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione
27 disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 2006, 1, 3159-3165, DOI: 10.1038/nprot.2006.378.
- 28 [24] Carrara, I. M.; Melo, G. P.; Bernardes, S. S.; Neto, F. S.; Ramalho, L. N. Z.; Marinello, P. C.; Luiz, R. C.;
29 Cecchini, R.; Cecchini, A. L. Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced
30 squamous cell carcinoma in hairless mice. *J Photochem Photobiol B* 2019, 195, 17-26, DOI:
31 10.1016/j.jphotobiol.2019.04.007.
- 32 [25] Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-
33 transferases. *Journal of biological chemistry* 1976, 251, 6183-6188, DOI: 10.1016/s0021-9258(20)81842-0.
- 34 [26] Souza Cruz, E. M.; Bitencourt de Moraes, J. M.; Rosa, C.; Simoes, M. D. S.; Comar, J. F.; Chuffa, L. G. A.;
35 Seiva, F. R. F. Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic
36 oxidative stress in wistar rats. *Biol Open* 2020, DOI: 10.1242/bio.047282.
- 37 [27] Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol
38 and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974, 47, 469-474, DOI.
- 39 [28] Ammar, O. A.; El-Missiry, M. A.; Othman, A. I.; Amer, M. E. Melatonin is a potential oncostatic agent to
40 inhibit HepG2 cell proliferation through multiple pathways. *Heliyon* 2022, 8, e08837, DOI:
41 10.1016/j.heliyon.2022.e08837.
- 42 [29] El-Sokkary, G. H.; Ismail, I. A.; Saber, S. H. Melatonin inhibits breast cancer cell invasion through
43 modulating DJ-1/KLF17/ID-1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 2019, 120, 3945-3957, DOI: 10.1002/jcb.27678.

- 1 [30] Mihanfar, A.; Yousefi, B.; Ghazizadeh Darband, S.; Sadighparvar, S.; Kaviani, M.; Majidinia, M. Melatonin
2 increases 5-fluorouracil-mediated apoptosis of colorectal cancer cells through enhancing oxidative stress and
3 downregulating survivin and XIAP. *Bioimpacts* 2021, 11, 253-261, DOI: 10.34172/bi.2021.36.
- 4 [31] Dios-Barbeito, S.; Gonzalez, R.; Cadenas, M.; Garcia, L. F.; Victor, V. M.; Padillo, F. J.; Muntane, J. Impact
5 of nitric oxide in liver cancer microenvironment. *Nitric Oxide* 2022, 128, 1-11, DOI: 10.1016/j.niox.2022.07.006.
- 6 [32] Hayes, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T.; Tew, K. D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* 2020, 38, 167-
7 197, DOI: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
- 8 [33] Osseni, R. A.; Rat, P.; Bogdan, A.; Warnet, J. M.; Touitou, Y. Evidence of prooxidant and antioxidant
9 action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci* 2000, 68, 387-399, DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00955-
10 3.
- 11 [34] Dakshayani, K. B.; Subramanian, P.; Manivasagam, T.; Essa, M. M.; Manoharan, S. Melatonin modulates
12 the oxidant-antioxidant imbalance during N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *J*
13 *Pharm Pharm Sci* 2005, 8, 316-321, DOI.
- 14 [35] Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolin, I.; Herrera, F.; Martin, V.; Reiter, R. J. Regulation of
15 antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004, 36, 1-9, DOI: 10.1046/j.1600-
16 079x.2003.00092.x.
- 17 [36] Yang, H.; Xiong, J.; Luo, W.; Yang, J.; Xi, T. 8-Methoxypsoralen Induces Intrinsic Apoptosis in HepG2
18 Cells: Involvement of Reactive Oxygen Species Generation and ERK1/2 Pathway Inhibition. *Cell Physiol*
19 *Biochem* 2015, 37, 361-374, DOI: 10.1159/000430360.
- 20 [37] Cruz, A. L. S.; Barreto, E. A.; Fazolini, N. P. B.; Viola, J. P. B.; Bozza, P. T. Lipid droplets: platforms with
21 multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis* 2020, 11, 105, DOI: 10.1038/s41419-020-2297-3.
- 22 [38] Rakesh, R.; PriyaDharshini, L. C.; Sakthivel, K. M.; Rasmi, R. R. Role and regulation of autophagy in
23 cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2022, 1868, 166400, DOI: 10.1016/j.bbadis.2022.166400.
- 24 [39] Pistrutto, G.; Trisciuglio, D.; Ceci, C.; Garufi, A.; D'Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function
25 and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 2016, 8, 603-619, DOI:
26 10.18632/aging.100934.
- 27 [40] Carneiro, B. A.; El-Deiry, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020, 17, 395-
28 417, DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- 29 [41] Targhazeh, N.; Reiter, R. J.; Rahimi, M.; Qujeq, D.; Yousefi, T.; Shahavi, M. H.; Mir, S. M. Oncostatic
30 activities of melatonin: Roles in cell cycle, apoptosis, and autophagy. *Biochimie* 2022, 202, 34-48, DOI:
31 10.1016/j.biochi.2022.06.008.
- 32 [42] Long, F.; Dong, C.; Jiang, K.; Xu, Y.; Chi, X.; Sun, D.; Liang, R.; Gao, Z.; Shao, S.; Wang, L. Melatonin
33 enhances the anti-tumor effect of sorafenib via AKT/p27-mediated cell cycle arrest in hepatocarcinoma cell lines.
34 *RSC Adv* 2017, 7, 21342-21351, DOI: 10.1039/c7ra02113e.
- 35 [43] Martin-Renedo, J.; Mauriz, J. L.; Jorquera, F.; Ruiz-Andres, O.; Gonzalez, P.; Gonzalez-Gallego, J.
36 Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* 2008, 45, 532-
37 540, DOI: 10.1111/j.1600-079X.2008.00641.x.

38 **Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those
39 of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s)
40 disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or
41 products referred to in the content.

42
43
44

1 7. Conclusão Geral

2

3 Podemos mostrar neste trabalho que a Melatonina apresenta características
4 de um fármaco promissor para o tratamento de câncer de fígado uma vez que foi
5 efetivo contra células HuH7.5. Melatonina apresentou ação pró-oxidante, pela
6 capacidade de inibir a progressão celular e crescimento tumoral através do efeito
7 antiproliferativo, parada de ciclo celular, bem como, desencadeando a morte celular
8 por apoptose em células de carcinoma hepatocelular. Além disso, aumentou o
9 estresse oxidativo e induziu o estresse metabólico em células HuH7.5.
10 Demonstrando, portanto, a eficiência da atuação da melatonina no câncer de fígado
11 da linhagem celular HuH7.5.

12

13 8. REFERÊNCIAS GERAL

14 AMMAR, OA et al. Melatonin is a potential cell-inhibitory agent through hepG2 cells.
15 **Heliyon**, v. 8, n. 1, pág. e08837, 1 jan. 2022.

16

17 AO, N; CHEN, Q; LIU, G. The Small Molecules Targeting Ubiquitin-Proteasome
18 System for Cancer Therapy. **Comb Chem High Throughput Screen**.
19 2017;20(5):403-413. doi: 10.2174/1386207320666170710124746.

20

21 ARAVALLI, R. N. Role of innate immunity in the development of hepatocellular
22 carcinoma. **World J Gastroenterol**. v.19, 2013.

23

24 ARNAO, M.B.; HERNANDEZ-RUIZ, J.Melatonin as a regulatory hub of plant
25 hormone levels and action in stress situations. **Plant Biology**, v.23, p. 7-19, 2021.

26

27 BLACKADAR, C.B. Historical review of the causes of cancer. **World J Clin**
28 **Oncol**. Feb. v.10; p. 54–86. 2016

29

30 BRAHMA, M.K; GILGLIONI, E.H; ZHOU, L; TRÉPO, E; CHEN, P; GURZOV, E.N.
31 Oxidative stress in obesity-associated hepatocellular carcinoma: sources, signaling
32 and therapeutic challenges. **Oncogene**. 2021 Aug; 40(33): 5155–5167.

33

34 BENNUKUL, K.; NUMKLIANG, S.; LEARDKAMOLKARN, V. Melatonin attenuates
35 cisplatin-induced HepG2 cell death through the regulation of mTOR and ERCC1
36 expressions. **Revista Mundial de Hepatologia**, v. 6, n. 4, pág. 230, 4 abr. 2014.

37

38 BLIGHT KJ , MCKEATING JA, RICE CM. Linhagens celulares altamente
39 permissivas para replicação de RNA do vírus da hepatite C subgenômica e
40 genômica. **J Virol**. 2002 dez;76(24):13001-14. doi: 10.1128/jvi.76.24.13001-
41 13014.2002.

42

- 1 BRIGELIUS-FLOHE, R. Funções específicas do tecido de peroxidases de
2 glutationa individuais. **Free Radic Biol Med.** 1999; 27 (9–10):951–65.
3
- 4 BURCHA, P.C. Produtos genotóxicos da peroxidação lipídica: suas propriedades
5 prejudiciais ao DNA e papel na formação de adutos endógenos de
6 DNA. **Mutagênese.** 1998; 13 (3):287–305.
7
- 8 CATALA, A. A peroxidação lipídica de fosfolipídios de membrana gera
9 hidroxialquenais e fosfolipídios oxidados ativos em condições fisiológicas e/ou
10 patológicas. **Lipídios Químicos.** 2009; 157 (1):1–11.
11
- 12 CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology
13 of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v.9, p. 11-24, 2005.
14 COLEMAN, W.B. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. **Current**
15 **Molecular Medicine.** p.573-88. 2003.
16
- 17 COPIN, J.C; GASCHE, Y; CHAN, P.H. A superexpressão de superóxido dismutase
18 de cobre/zinco não previne a letalidade neonatal em camundongos mutantes que
19 não possuem superóxido dismutase de manganês. **Free Radic Biol**
20 **Med.** 2000; 28 (10): 1571-6.
21
- 22 COULOUARN, C; FACTOR, V.M; THORGEIRSSON, S.S. Transformar a
23 assinatura de expressão do gene do fator de crescimento beta em hepatócitos de
24 camundongos prediz o resultado clínico no câncer
25 humano. **Hepatologia.** 2008; 47 (6):2059–2067. doi: 10.1002/hep.22283.
26
- 27 CHOJNACKI C, WALECKA-KAPICA E, ROMANOWSKI M, CHOJNACKI J,
28 KLUPINSKA G. 2014. Proteção papel da melatonina no dano hepático. Projeto
29 farmacêutico atual 20(30):4828-4833.
30
- 31 CURTIN, S. C. Trends in cancer and heart disease death rates among adults aged
32 45–64: United States, 1999–2017. **In National Vital Statistics Reports**, vol. 68, pp.
33 1-9, 2019.
34
- 35 DIMRI M, SATYANARAYANA A. Molecular Signaling Pathways and Therapeutic
36 Targets in Hepatocellular Carcinoma. **Cancers (Basel).** 2020 Feb 20;12(2):491. doi:
37 10.3390/cancers12020491.
38
- 39 DICKINSON DA, FORMAN HJ. Metabolismo celular da glutationa e dos tióis.
40 **Biochem Pharmacol.** 2002 set;64(5-6):1019-26. doi: 10.1016/s0006-
41 2952(02)01172-3.
42
- 43 DUBBELBOER, I. R.; PAVLOVIC, N.; HEINDRYCKX, F.; SJOGREN, E.;
44 LENNERNAS, H. Liver Cancer Cell Lines Treated with Doxorubicin under Normoxia
45 and Hypoxia: Cell Viability and Oncologic Protein Profile. **Cancers (Basel).** 2019.
46 ESPOSITO, S.; LAINO, D.; D'ALONZO, R. et al. Pediatric sleep disturbances and
47 treatment with melatonin. **J. Transl. Med.** 2019.
48
- 49 FAN L, SUN G, MA T, ZHONG F, WEI W. Melatonin overcomes apoptosis

- 1 resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting survivin and XIAP. *J*
2 *Pineal Res.* 2013 Sep;55(2):174-83. doi: 10.1111/jpi.12060.
- 3
- 4 FAN L.-L., SUN G.-P., WEI W., WANG Z.-G., GE L., FU W.-Z., WANG H. Melatonina
5 e Doxorubicina induzem sinergicamente apoptose celular em humanos linhagens
6 celulares de hepatoma. **World J. Gastroenterol.** 2010; 16 :1473-1481. doi:
7 10.3748/wjg.v16.i12.1473.
- 8
- 9 FEIGELSTOCK, D.A; MIHALIK, K.B; KAPLAN, G; FEINSTONE, S.M. A
10 suscetibilidade aumentada das células Huh7 à replicação do HCV não requer
11 mutações no RIG-I. **Virol.** 2010. J. 7 : 44 . 10.1186/1743-422x-7-44
- 12
- 13 FERNANDEZ-PALANCA, P., C. MENDEZ-BLANCO, F. FONDEVILA, M. J.
14 TUNON, R. J. REITER, J. L. MAURIZ AND J. GONZALEZ-GALLEGO (2021).
15 "Melatonin as an Antitumor Agent against Liver Cancer: An Updated Systematic
16 Review." *Antioxidants (Basel)* 10(1).
- 17
- 18 FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **The Lancet**, v. 391,
19 n. 10127, p. 1301–1314, 2018.
- 20 Forman HJ , Zhang H, Rinna A. Glutathione: visão geral de seus papéis protetores,
21 medição e biossíntese. *Mol Aspects Med.* 2009 fev-abr;30(1-2):1-12. doi:
22 10.1016/j.mam.2008.08.006
- 23
- 24 GELALETI GB, BORIN TF, MASCHIO-SIGNORINI LB, MOSCHETTA MG,
25 JARDIM-PERASSI BV, CALVINHO GB, FACCHINI MC, VILORIA-PETIT AM, DE
26 CAMPOS ZUCCARI DAP. Efficacy of melatonin, IL-25 and siIL-17B in
27 tumorigenesis-associated properties of breast cancer cell lines. *Life Sci.* 2017 Aug
28 15;183:98-109. doi: 10.1016/j.lfs.2017.06.013. Epub 2017 Jun 15.
- 29
- 30 GERETS, H.H; TILMANT, K; GERIN, B; CHANTEUX, H; DEPELCHIN, B.O;
31 DHALLUIN, S; ATIENZAR, F.A. Characterization of primary human hepatocytes,
32 HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to
33 inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. **Cell**
34 **Biol. Toxicol.** 2012; 28 :69-87.
- 35
- 36 GERETS, H.H.J; HANON, E; CORNET, M; DHALLUIN, S; DEPELCHIN, O;
37 CANNING, M; ATIENZAR, F.A. Seleção de marcadores de citotoxicidade para a
38 triagem de novas entidades químicas em um contexto farmacêutico: um estudo
39 preliminar usando uma abordagem de multiplexação. **Toxicol in**
40 **vitro.** 2009; 23 :319-332. doi: 10.1016/j.tiv.2008.11.012.
- 41
- 42 GLOBOCAN. Cancer Tomorrow, vol. 2020 (ed. WHO): **International Agency for**
43 **Research on Cancer.** 2020
- 44 HARDELAND, R. Melatonin in plants—Diversity of levels and multiplicity of
45 functions. **Front. Planta Sci.** 2016.
- 46

- 1 HAYES, J.D; FLANAGAN, J.U; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu Rev**
2 **Pharmacol Toxicol.** 2005; 45 :51-88.
3
- 4 HASHIMOTO, F; HAYASHI, H. Significado da catalase na beta-oxidação de acil-
5 CoA graxo peroxissomal: oxidação de NADH por acetoacetil-CoA e H₂O₂. **J**
6 **Biochem.** 1990; 108 (3):426–31.
7
- 8 HOFMANN, B; HECHT, H.J; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biol**
9 **Química.** 2003; 383 (3-4): 347-64.
10
- 11 IDELCHIK, M.D.P.S.; BEGLEY, U.; BEGLEY, T.J.; MELATONINENDEZ, J.Á.
12 Mitochondrial ROS cancer control. **Semin. Câncer Biol.** v.47, p.57-66. 2017.
13
- 14 IMLAY, J.A; CHIN, S.M; LINN, S. Danos tóxicos ao DNA por peróxido de hidrogênio
15 através da reação de Fenton in vivo e in vitro. **Ciência.** 1988; 240 (4852):640–2.
16
- 17 INCA Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020:
18 Incidência de Câncer no Brasil: **Ministério da Saúde.** 2019.
- 19 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Estimated
20 number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. Disponível em:
21 **<<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>>**. Acesso em: 23 ago. 2021.
- 22 IRIGARAY, P.; BELPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of
23 exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v.31, p.135–148, 2010.
- 24 JAKOBI, K.; BEYER, S.; KOCH, A.; THOMAS, D.; SCHWALM, S. et al. Sorafenib
25 Treatment and Modulation of the Sphingolipid Pathway Affect Proliferation and
26 Viability of Hepatocellular Carcinoma In Vitro. **Int J Mol Sci.** 2020.
- 27 KASECKER, F.G.; NUNES, C.P. Melatonin and pineal gland. **Rev. da Faculdade**
28 **de Med. de Teresópolis**, v.1, n.1, 2017.
- 29 KAWAMOTO, M., T. YAMAJI, K. SAITO, Y. SHIRASAGO, K. SATOMURA, T.
30 ENDO, M. FUKASAWA, K. HANADA AND N. OSADA (2020). "Identification of
31 Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell
32 Lines." *Front Genet* 11: 546106.
33
- 34 KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical
35 carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology.** p.543-555, 2000.
- 36 KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular
37 response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J.** 2016.
- 38 LAFARO, K. J.; DEMIRJIAN, A. N.; PAWLIK, T. M. Epidemiology of hepatocellular
39 carcinoma. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 24, n. 1, p. 1-17, 2015.
40
- 41 LAUSCHKE, H et al. Peroxidação lipídica como marcador adicional em pacientes
42 com câncer colorretal. Resultados de um estudo preliminar. **Eur Surg**

- 1 **Res.** 2002; 34 (5):346–50.
2
- 3 LEE, D. Y.; PARK, Y. J.; SONG, M. G.; KIM, D. R.; ZADA, S. et al. Cytoprotective
4 Effects of Delphinidin for Human Chondrocytes against Oxidative Stress through
5 Activation of Autophagy. **Antioxidants (Basel)**. 2020.
- 6 LERNER, A.B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y. Isolation of melatonin and 5-
7 methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. **J Biol Chem**. 1992-1997.
8 1960.
- 9 LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.;
10 GARGIULO, G.; TESTA, G.; CACCIATORE, F.; BONADUCE, D., et al. Oxidative
11 stress, aging diseases. **Clin. Interv. Aging**. v.13, p.757-772. 2018.
12
- 13 LIN S, HOFFMANN K, GAO C, PETRULIONIS M, HERR I, SCHEMMER P. 2017.
14 A melatonina promove apoptose induzida por sorafenibe através da ativação
15 sinérgica da via JNK/c-jun em carcinoma hepatocelular humano. *Journal of Pineal*
16 *Research* 62.(3)
17
- 18 LIU, YEWEI; YIN, TING; FENG, YUANBO; et al. Mammalian models of chemically
19 induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic
20 research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729,
21 2015.
- 22 MAGANHIN, C.C. et al. Effects of melatonin on the female genital system: a brief
23 review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, 2008.
- 24 MA, Y. S., J. B. LIU, T. M. WU; D. FU (2020). "New Therapeutic Options for
25 Advanced Hepatocellular Carcinoma." **Cancer Control** 27(3): 1073274820945975.
26
- 27 MARTÍN-RENEDO, J; MAURIZ, J.L; JORQUERA, F; RUIZ-ANDRÉS, O.;
28 GONZÁLEZ, P; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A melatonina induz a parada do ciclo
29 celular e apoptose em hepatocarcinoma linha celular HepG2. **J. Pineal**
30 **Res.** 2008; 45 :532-540. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00641.x.
31
- 32 MARQUARDT, J. U.; ANDERSEN, J. B.; THORGEIRSSON, S. S. Functional and
33 genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. **Nature Reviews Cancer**,
34 v. 15, n. 11, p. 653–667, 2015.
- 35 MASARONE, M., V. ROSATO, M. DALLIO, A. G. GRAVINA, A. AGLITTI, C.
36 LOGUERCIO, A. FEDERICO; M. PERSICO. "Role of Oxidative Stress in
37 Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." **Oxid Med Cell Longev**
38 2018: 9547613.
39
- 40 MCGLYNN, K. A.; PETRICK, J. L.; EL-SERAG, H. B. Epidemiology of
41 Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**. 2020.
- 42 MI, L; KUANG, H. A melatonina regula a resistência à cisplatina e o metabolismo
43 da glicose através da sinalização do hipopótamo em células de carcinoma

- 1 hepatocelular. **Gestão do Câncer. Res.** 2020; 12 :1863-1874. doi:
2 10.2147/CMAR.S230466
3
- 4 MITRA, S, et al. Complexidades da via de reparo por excisão de bases de DNA
5 para reparo de danos oxidativos no DNA. **Environ Mol Mutagen.** 2001; 38 (2–
6 3):180–90
7
- 8 MOLONEY, J.N; COTTER, T.G "Sinalização de ROS na biologia do câncer",semin.
9 Cell Dev. **Biol.**, vol. 80, pág. 50-64, 2018.
10
- 11 MORTEZAEE, K. Human hepatocellular carcinoma: Protection by melatonin. **J Cell**
12 **Physiol.** v.233, p.6486-6508. 2018.
- 13 MORTEZAEE, K.; KHANLARKHANI, N. Melatonin application in targeting
14 oxidativeinduced liver injuries: A review. **J Cell Physiol.** v.233, p.4015-4032. 2018.
- 15 NETO, J.A.S.; DE CASTRO, B.F. Melatonin, biological rhythms and sleep a review
16 of the literature. **Rev Bras Neurol.** 2008.
- 17 NORTH, J.A; SPECTOR, A.A; BUETTNER, G.R. A composição de ácidos graxos
18 da célula afeta a formação de radicais livres durante a peroxidação lipídica. **Am J**
19 **Physiol.** 1994; 267 (1 Pt 1):C177-88.
20
- 21 NWOSU, Z. C., N. BATTELLO, M. ROTHLEY, W. PIORONSKA, B. SITEK, M. P.
22 EBERT, U. HOFMANN, J. SLEEMAN, S. WOLFL, C. MEYER, D. A. MEGGER AND
23 S. DOOLEY (2018). "Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene
24 expression pattern of the corresponding human tumours." **J Exp Clin Cancer Res**
25 **37(1): 211.**
26
- 27 OLIVEIRA, P.A. et al. Chemical carcinogenesis. **Proceedings of the Brazilian**
28 **Academy of Sciences**, v.79, p. 593-616, 2007.
- 29 OSSENI, R. A.; RAT, P.; BOGDAN, A.; WARNET, J. M.; TOUITOU, Y. Evidence of
30 prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. **Life**
31 **Sci.** v.68, p.387-99, 2000.
- 32 PAGE, A.J. et al. Hepatocellular carcinoma. Diagnosis, management, and
33 prognosis. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v.23, n.2, p.289-311,
34 2014.
- 35 PANDA,P.K; MUKHOPADHYAY,S; DAS,D.N; SINHA,N; NAIK,P.P; BHUTIA, S.K.
36 Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics,
37 **Semin. Cell Dev. Biol.** 39 (2015) 43–55. doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.013.
- 38 PANG, Y.W.; SUN, Y.Q.; SUN, W.J.; DU, W.H.; HAO, H.S.; ZHAO, S.J.; ZHU, H.B.
39 Melatonin inhibits paraquat-induced cell death in pre-implantation bovine embryos.
40 **J. Pineal Res.** v.60, p.155-166, 2016.
41
- 42 PINHO, S.; REIS, C. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications.

- 1 **Nat Rev Cancer**. v.15, p.540–555, 2015.
- 2 PRIETO-DOMINGUEZ, N.; ORDONEZ, R.; FERNANDEZ, A.; MENDEZ-BLANCO,
3 C.; BAULIES, A. et al. Melatonin-induced increase in sensitivity of human
4 hepatocellular carcinoma cells to sorafenib is associated with reactive oxygen
5 species production and mitophagy. **J Pineal Res**. v.61, p.396-407. 2016.
- 6 RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R. et al. Oxidative stress,
7 prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int**. 2014.
- 8 REITER, R. J.; SHARMA, R.; ROSALES-CORRAL, S. A.; COTO-MONTES, A.;
9 BOGA, J. A. et al. Advances in Characterizing Recently-Identified Molecular Actions
10 of Melatonin: Clinical Implications. In *Approaching Complex Diseases: Network-
11 Based Pharmacology and Systems Approach in Bio-Medicine*, p. 301-341. **Cham:
12 Springer International Publishing**. 2020.
- 13 RUMGAY, H.; MURPHY, N.; FERRARI, P.; SOERJOMATARAM, I. Alcohol and
14 Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. **Nutrients**. 2021.
- 15 SASSA, S; SUGITA, O; GALBRAITH, R.A; KAPPAS, A. Metabolismo de drogas
16 pela célula de hepatoma humano, HepG2. **Biochem Biophys Res
17 Commun**. 1987; 143 :52-57. doi: 10.1016/0006-291X(87)90628-0.
18
- 19 SHARMA, R, et al. Papel antioxidante das glutationa S-transferases: proteção
20 contra a toxicidade oxidante e regulação da apoptose mediado pelo estresse. **Sinal
21 Redox Antioxid**. 2004; 6 (2):289–300.
22
- 23 SARANGARAJAN R, MEERA S, RUKKUMANI R, SANKAR P, ANURADHA G.
24 Antioxidants: Friend or foe?. **Asian Pac J Trop Med**. 2017 Dec;10(12):1111-1116.
25 doi: 10.1016/j.apjtm.2017.10.017.
26
- 27 SHI, C.; YANG, H.; ZHANG, Z. Involvement of Nucleotide-Binding Oligomerization
28 Domain-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome in the
29 Pathogenesis of Liver Diseases. **Front Cell Dev Biol**. v.8, 2020.
- 30 SHIRAHA H, YAMAMOTO K, NAMBA M. Human hepatocyte carcinogenesis
31 (review). *Int J Oncol*. 2013 Apr;42(4):1133-8. doi: 10.3892/ijo.2013.1829. Epub
32 2013 Feb 19.
33
- 34 SIES, H; JONES, D.P. Espécies reativas de oxigênio (ROS) como agentes de
35 sinalização fisiológica pleiotrópica . **Nat Rev Mol Cell Biol** . 2020; 21 :363-383.
36
- 37 SINGH, A. K.; KUMAR, R.; PANDEY, A. K. Hepatocellular Carcinoma: Causes,
38 Mechanism of Progression and Biomarkers. **Curr Chem Genom Transl Med**. v.12,
39 p.9-26. 2018.
- 40 SCHULZE, K.; NAULT, J. C.; VILLANUEVA, A. Genetic profiling of hepatocellular

- 1 carcinoma using next-generation sequencing. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 5,
2 p. 1031–1042, 2016.
- 3 SLOMINSK RM, et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues:
4 distribution and functions. **Molecular and cellular endocrinology**. v.351, p.152-
5 166. 2012.
6
- 7 SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence
8 and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal**
9 **for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- 10 SU, S.C.; HSIEH, M.J.; YANG, W.E.; CHUNG, W.H.; REITER, R.J.; YANG, S.F.
11 Cancer metastasis: Melatonin inhibition mechanisms. **J. Pineal Res.** v.62,
12 p.12370, 2017.
13
- 14 TAN DX, MANCHESTER LC, ESTEBAN-ZUBERO E, ZHOU Z, REITER RJ.
15 Melatonina como um potente e antioxidante endógeno induzível: síntese e
16 metabolismo. *Moléculas*. 2015. 20(10):18886-18906.
17
- 18 TAKESHIMA, H.; USHIJIMA, T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations
19 in normal cells and cancer risk. **Precision Oncology**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2019.
- 20 TRACHOOTHAM, D; ALEXANDRE, J; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-
21 mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009
22 Jul;8(7):579-91. doi: 10.1038/nrd2803. Epub 2009 May 29.
23
- 24 TORRECILLA, S. et al. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-
25 tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 67,
26 n. 6, p.1222–1231, 2017.
- 27 TOWNSEND, D.M; TEW, K.D. O papel da glutationa-S-transferase na resistência a
28 drogas anticâncer. *Oncogene*. 2003; 22 (47):7369–75.
29
- 30 URSINI, F, et al. Diversidade de glutationa peroxidases. *Métodos*
31 *Enzimol*. 1995; 252 :38-53.
32
- 33 VENEGAS C, GARCÍA JA, ESCAMES G, ORTIZ F, LÓPEZ A, DOERRIER C,
34 GARCÍA-CORZO L, LÓPEZ LC, REITER RJ, ACUÑA-CASTROVIEJO D.
35 Melatonina extrapineal: análise de sua distribuição subcelular e flutuações diárias.
36 **Journal of Pineal Research**. 2012. 52(2):217- 227
37
- 38 XU, J.J; DIAZ, D; O'BRIEN, P.J. Aplicações de ensaios de citotoxicidade e ensaios
39 mecanísticos pré-letais para avaliação do potencial de hepatotoxicidade
40 humana. **Chem Biol Interact**. 2004; 150 :115-128. doi: 10.1016/j.cbi.2004.09.011.
41
- 42 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); International Association of Cancer
43 Registries (IARC) (2018). Cancer today. Disponível

- 1 em:<<https://gco.iarc.fr/today/home>> acesso em15/01/2019.
- 2 YARH,G; STORZ, P. Reactive oxygen species in câncer. **HSS**. May; 44(5). 2014.
3 Doi: 10.3109/10715761003667554.
- 4 YUZUGULLU H, BENHAJ K, OZTURK N, SENTURK S, CELIK E, TOYLU A,
5 TASDEMIR N, YILMAZ M, ERDAL E, AKCALI KC, ATABEY N, OZTURK M. A
6 sinalização Wnt canônica é antagonizada por Wnt5a não canônico em células de
7 carcinoma hepatocelular . **Mol Câncer**. 2009; 8:90 . doi: 10.1186/1476-4598-8-90.
8
- 9 ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen
10 species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**. v.94, p.909-50, 2014.