



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Sabrina Azevedo Machado

**O papel da melatonina na modulação dos parâmetros carcinogênicos, função
mitocondrial e piroptose em células de câncer gástrico AGS**

Dissertação de mestrado

Brasília
24 de Fevereiro de 2023

Sabrina Azevedo Machado

**O papel da melatonina na modulação dos parâmetros carcinogênicos,
função mitocondrial e piroptose em células de câncer gástrico AGS**

Dissertação de mestrado
apresentado ao Programa de
Pós-graduação em
Patologia Molecular, como
parte dos requisitos
necessários à obtenção do
título de Mestre em
Patologia Molecular.

Orientadora: Kelly Grace Magalhães

Brasília
24 de Fevereiro de 2023

Sabrina Azevedo Machado

O papel da melatonina na modulação dos parâmetros carcinogênicos, função mitocondrial e piroptose em células de câncer gástrico AGS

Brasília
24 de Fevereiro de 2023

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente) Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular Universidade de Brasília

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni (Membro Externo)
Universidade de São Paulo

Prof.^a. Dra. Andrea Barreto Motoyama (Membro Interno)
Universidade de Brasília

Prof.^a. Dra. Paula Maria Quoglio Bellozi (Membro Suplente)
Universidade de Brasília

Dedicatória

Dedico, em especial, a minha mãe, Maria Luiza, que faleceu em decorrência de um adenocarcinoma gástrico, e ao meu pai Augusto César por todo apoio, amor e paciência.

Dedico a minha avó Zilda e a minha tia Izabel Cristina pelo suporte, proteção e carinho.

Dedico a toda minha família por quem tenho grande apreço e admiração, aos meus amigos que se tornaram família de caminhada e princípios. Ressalto os meus amigos de laboratório, uma terceira família que construímos, que contribuíram para o meu amadurecimento científico e profissional.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus e toda a espiritualidade que acredito me acompanhar e mentorear o meu processo de evolução terrena.

Agradeço em especial a minha querida mãe que me gestou e cuidou de mim até os seus últimos segundos em vida. Por servir a mim como principal propósito e inspiração para a minha pesquisa. Agradeço ao meu pai, por exercer de forma tão doce, leve e respeitosa a árdua função da paternidade. Por me apoiar e confiar em todas as decisões que tomo e mesmo sem entender se alegrar e orgulhar de todas as minhas conquistas. À minha irmã gêmea Samantha que em muitos momentos de receios e anseios me acolheu e incentivou nessa jornada.

Agradeço a minha orientadora e grande amiga professora Kelly que com grande maestria, delicadeza e empatia desperta em nós os mais altos níveis de humanidade, competência e profissionalismo. De todas as decisões que tomei no passado, tê-la escolhido como orientadora foi com certeza a mais acertada delas. Sua orientação não apenas me tornou a profissional que sou hoje, mas me inspira como a mulher que quero me tornar.

Agradeço a minha tia, Izabel Cristina, minha prima Mel e meu primo Daniel que hoje tenho como base. Agradeço por todo acolhimento e cuidado em momentos de maior dificuldade, pela sinceridade do amor disposto a tudo sem esperar nada em troca. À minha avó Zilda, por quem sou completamente apaixonada, por todos os conselhos, preocupação e risadas. Às minhas tias Terezinha e Aparecida por tanta garra, altruísmo e proteção, por todo carinho, dedicação e proteção que possuem pela minha pessoa. À minha tia Lúcia, Kátia e ao meu tio Edson por sempre incentivarem e investirem na minha educação. Por todas as conversas acalentadores sobre futuro profissional e toda confiança. A todos os primos e tios por todo amor e carinho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório na qual hoje me sinto confortável em chamar de família. À minha irmã de outra mãe, Heloísa, por todos os conselhos, ajudas e consolos. Por toda referência como mulher e pesquisadora que é para mim. Ao meu irmão Gabriel Pasquarelli, a quem amo implicar. Homem do coração mais nobre que pude ter a felicidade de conhecer, além de ser uma grande enciclopédia humana. Ao meu irmão Gabriel Ribeiro, por todas as contribuições científicas e gargalhadas. Por tornar os meus dias mais alegres com a sua presença. À Raquel que foi uma das principais incentivadoras do meu ingresso no mestrado. À Júlia, Milena, Débora, Fernanda, Sarah, Nathália, Ramon, Calixto, Aninha e Paula por todas as contribuições científicas, experimentais e momentos de descontrações. Ao Chiquinho que sempre com muito bom humor nos auxilia e livra de todos os perrengues possíveis dentro do laboratório. Além do seu cuidado em nos receber todos os dias de manhã com café fresquinho, tornando o nosso trabalho melhor.

Agradeço as minhas colegas de faculdade, em especial, Giovanna, Thaís, Jade, Carol, Ísis, Roma e Elton pelos anos de amizade sincera e apoio incondicional. À minha amiga, Laura Beatriz por tantos anos de companheirismo e parceria, agradeço de antemão a certeza de uma amizade por toda a vida. Ao meu amigo Matheus por todas as conversas, apoio e compreensão. À minha amiga Marina Minari que foi essencial em todo o processo de defesa, me dando amparo e sendo uma sincera e necessária companheira no processo.

À minha amiga Marina Bruno que sempre ouviu meus anseios e receios quanto a vida acadêmica e sempre se dispôs a me ouvir e aconselhar no processo.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular por possibilitar a realização desse projeto, à UnB que se tornou minha segunda casa. Aos colaboradores Paula Bellozi, Bruno Milhomem, Daniel Moreira, Ana Gouveia, professoras Andreza de Bem, Sônia Bao e professor Bergmann. Às agências de fomento CNPq e FAPDF pelo suporte financeiro prestado.

"Avalia-se a inteligência de um indivíduo pela quantidade de incertezas que ele é capaz de suportar"

Immanuel Kant

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	11
Lista de Abreviações.....	12
Lista de Figuras.....	14
1. Introdução	16
Melatonina Pineal.....	17
Melatonina Extra Pineal.....	19
Câncer.....	21
Câncer Gástrico.....	22
Estresse oxidativo, metabolismo e câncer.....	24
Morte celular.....	27
2. Justificativa.....	33
3. Objetivo Geral.....	34
3.1 Objetivos Específicos	34
4. Materiais e Métodos.....	35
5. Resultados.....	43
5.1. A melatonina reduziu a viabilidade celular mitocondrial.....	43
5.2. A melatonina reduziu a proliferação celular de células de câncer gástrico.....	44
5.3. A melatonina aumentou o aprisionamento de células de câncer gástrico na fase G1.....	45
5.4. A concentração de 5mM de melatonina promoveu o aumento da fragmentação nuclear em 48 e 72h.....	46
5.5 A melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dose e tempo dependente.....	47
5.6 A melatonina promoveu a redução da produção de espécies reativas em tempos iniciais e o subsequente aumento após 24 horas de estímulo.....	48

5.7 A melatonina reduziu a respiração oxidativa das células de câncer gástrico.....	50
5.8 A melatonina reduziu os níveis de tGSH e GSH em células de câncer gástrico AGS...	51
5.9 A melatonina modulou a dinâmica mitocondrial de células de câncer gástrico AGS..	53
5.10 A melatonina modulou o perfil inflamatório de células de câncer gástrico.....	54
5.11 A melatonina promoveu o aumento de morte das células de câncer gástrico AGS de maneira dose dependente.....	55
5.12 A melatonina reduziu a liberação da enzima lactato desidrogenase pelas células de câncer gástrico AGS.....	58
5.13 A melatonina reduziu a expressão de pró-caspase 1 após 24 horas de estímulo.....	57
5.14 A concentração de 5mM de melatonina alterou a expressão de Gasdermina D em 24horas.....	59
5.15 A melatonina promoveu a redução da formação de poros na membrana plasmática	60
5.16 O pós tratamento com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM foram capazes de prevenir a formação de poros de membrana plasmática induzido por LPS e ATP.....	61
6 Discussão.....	65
7 Conclusão.....	73
8 Produções científicas.....	74
Referências.....	77

Resumo

A melatonina é uma indolamina ubiquamente expressa na natureza sendo produzida de forma endógena. Em mamíferos, essa indolamina exerce função endócrina e autócrina coordenando as mais diferentes funções fisiológicas do organismo como ciclo circadiano, resposta imune, balanço oxidativo, perfil inflamatório, proteção celular entre outros. As recentes caracterizações do potencial terapêutico da melatonina têm despertado a atenção para os seus efeitos antitumorais. Atualmente, já é descrito que a melatonina exerce papel oncostática, anti-angiogênica, anti-metastática, modulação metabólica e pró-apoptótica em diversas linhagens tumorais. No entanto, pouco se sabe sobre o papel da melatonina na função mitocondrial e modulação de morte celular lítica em células de câncer gástrico AGS. O objetivo desse estudo é analisar os efeitos da melatonina sobre parâmetros carcinogênicos, função mitocondrial e de morte piroptótica em células de câncer de gástrico humano AGS *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que a melatonina promove redução da viabilidade celular mitocondrial em células de câncer gástrico AGS através da indução de alterações morfológicas e funcionais da mitocôndria. Ela também promoveu redução da produção de espécies reativas em tempos iniciais e o subsequente aumento em tempos tardios de estímulo. Além disso, essa indolamina exerceu a redução da ativação celular através da redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, bem como da proliferação tumoral através do aprisionamento de células na fase G1. Em concordância com a literatura, a melatonina promoveu aumento de morte apoptóticas nas células de câncer gástrico AGS. Contudo, a melatonina preveniu a formação de poros na membrana, mesmo sob estímulo de indutores como LPS e ATP, promoveu redução da expressão de proteínas efetoras da piroptose como GSDMD e pró-caspase 1, bem como a redução da liberação da enzima LDH e IL-1 β , esta última apenas na maior concentração de estímulo. Por fim, diferentes concentrações de melatonina promoveram modulações diferenciais da produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . Em síntese, o presente trabalho caracterizou o impacto da melatonina sobre diversos parâmetros celulares de células AGS, além de indicar o efeito atenuador de melatonina sobre a morte piroptótica nessas células.

Palavras-chave: Câncer; Melatonina; Piroptose; Mitocôndria;

Abstract

Melatonin is an indoleamine ubiquitously expressed in nature and produced endogenously. In mammals, this indolamine has an endocrine and autocrine function, coordinating the most different physiological functions of the organism, such as the circadian cycle, immune response, oxidative balance, inflammatory profile, cell protection, among others. Recent characterizations of the therapeutic potential of melatonin have drawn attention to its antitumor effects. Currently, it is already described that melatonin plays an oncostatic, anti-angiogenic, anti-metastatic, metabolic modulation and pro-apoptotic role in several tumor cell lines. However, little is known about the role of melatonin in mitochondrial function and modulation of lytic deaths in AGS gastric cancer cells. The aim of this study is to analyze the effects of melatonin on carcinogenic parameters, mitochondrial function and pyroptotic cell death in AGS human gastric cancer cells *in vitro*. Our results demonstrated that melatonin promotes reduction of mitochondrial cell viability in AGS gastric cancer cells by inducing morphological and functional alterations of the mitochondria. It promoted a reduction in the production of reactive species in early times and the subsequent increase in late times of stimulation. In addition, this indolamine exerted a reduction in cell activation by reducing the biogenesis of lipid bodies, as well as tumor proliferation by arresting cells in the G1 phase. In agreement with the literature, melatonin promoted an increase in apoptotic death in AGS gastric cancer cells. However, indolamine prevented the formation of membrane pores, even under the stimulus of inducers such as LPS and ATP, and promoted a reduction in the expression of pyroptosis effector proteins such as GSDMD and pro-caspase 1. In addition to promoting a reduction in the release of the enzyme LDH and IL -1 β , the latter only at the highest stimulus concentration. Finally, different concentrations of melatonin promoted differential modulations in the production of inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . In summary, the present work characterized the impact of melatonin on several cellular parameters of AGS cells, in addition to indicating the attenuating effect of melatonin on pyroptotic cell death in these cells.

Keywords: Cancer; Melatonin; Pyroptosis; Mitochondria

Lista de abreviações

5-HRT	5-hidroxitriptofano descarboxilase
AA-NAT	Aralquilamina N-acetiltransferase
AFMK	N1-acetil-n2-formil-5-metoxicinuramina
AIM	Receptor do tipo ausente em melanoma
AMK	N1-acetil-5-metoxicinuramina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Receptor adrenérgico
ASMT	Acetilserotonina-O-metiltransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	Proteína X associada a BCL2
C3OHM	3-hidroxi-melatonina cíclica
CDK	Quinase dependentes de ciclinas
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
Caspase	Protease aspártica de cisteína
CoA	Coenzima A
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DRP1	Proteína 1 relacionada a dinamina
FIS1	Proteína homóloga de fissão 1
GCP	Gânglios cervicais posteriores
GISTs	Tumores estromais gastrointestinais
GSDMD	Gasdermina D
HIF-1	Fator de transcrição induzível por hipóxia
HIOMT	Hidroxi-indol-O-metiltransferase
IL-	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDH	Enzima lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MFF	Fator de fissão mitocond
MT1	Receptor de alta afinidade acoplada a proteína G 1
MT2	Receptor de alta afinidade acoplada a proteína G 2

NE	Noraepinefrina
NET	Tumores neuroendócrinos
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor do tipo NOD
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA1	Optic Atrophy 1
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PDC	Complexo piruvato desidrogenase
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
RNS	Espécie(s) reativa(s) de nitrogênio
ROS	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
RZR/ROR	Receptor órfão relacionado ao ácido retinóico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TGI	Trato gastrointestinal
TRL	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TPH	Triptofano-5-hidroxilase
VEGF	Fator de crescimento vascular

Lista de Figuras

Figura 1. Síntese de melatonina

Figura 2. Síntese de melatonina na mitocôndria e metabolismo celular

Figura 3. Mecanismo de ativação da piroptose

Figura 4. Melatonina reduz a viabilidade celular mitocondrial de células de câncer gástrico AGS

Figura 5. Melatonina reduz a capacidade proliferativa de células de câncer gástrico AGS

Figura 6. Melatonina modula as fases do ciclo celular de células de câncer gástrico AGS

Figura 7 Melatonina induz fragmentação nuclear de células de câncer gástrico

Figura 8. Melatonina reduz a biogênese de corpúsculos lipídicos de células de câncer gástrico AGS

Figura 9. Melatonina promove a redução e subsequente aumento da produção de espécies reativas em células de câncer gástrico AGS

Figura 10. Melatonina reduz a respiração celular de células de câncer gástrico AGS

Figura 11. Melatonina promove alterações morfológicas, de abundância e distribuição de células de câncer gástrico AGS

Figura 12. Melatonina promove alterações morfológicas, de abundância e distribuição de células de câncer gástrico AGS

Figura 13. Melatonina reduziu os níveis de glutathiona total (tGSH) e reduzida (GSH) em células de câncer gástrico AGS

Figura 14. Melatonina induz a morte de células de câncer gástrico AGS

Figura 15. Melatonina reduz a liberação de LDH por células de câncer gástrico AGS

Figura 16. Melatonina reduz a expressão de pró-caspase 1 em células de câncer gástrico AGS

Figura 17. A concentração de 5mM reduz a expressão de GSDMD em 24 horas de estímulo

Figura 18. Melatonina previne a formação de poros na membrana plasmática em células de câncer gástrico AGS

Figura 19. LPS e ATP induzem a formação de poros em células de câncer gástrico AGS

Figura 20. Melatonina previne a formação de poros induzida por LPS e ATP em células de câncer gástrico AGS

1. Introdução

A melatonina é uma indolamina altamente conservada de caráter anfifílico expressa ubiquamente na natureza, sendo encontrado desde organismos unicelulares como bactérias até organismos mais complexos como plantas e animais. Em organismos primitivos, a produção de melatonina está associada a um mecanismo de neutralização da geração de radicais livres que configuram um risco para a integridade dos mesmos (ZHAO *et al.*, 2019). Ao longo do processo evolutivo essa molécula adquiriu a capacidade de sincronizar estímulos ambientais, como ciclo circadiano e sazonais, ao relógio biológico, bem como promover adaptações fisiológicas em organismos mais complexos através de modulações endócrinas. Em vertebrados, a melatonina pode ser obtida de maneira exógena, através da dieta, e endógena através da sua síntese extra pineal ou pineal. Neste contexto, a depender da localização da síntese da melatonina, a melatonina pode desempenhar funções endócrinas, parácrinas, autócrinas e antioxidantes (ARENDDT, 2018; MENG *et al.*,).

A síntese dessa molécula, por sua vez, é oriunda do processo de descarboxilação do aminoácido triptofano e ocorre em uma cadeia de reação enzimática de quatro etapas (fig. 1). O processo inicia-se a partir da hidroxilação do L-triptofano em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano-5-hidroxilase (TPH). Em seguida, o 5-hidroxitriptofano é descarboxilado em 5-hidroxitriptamina, também conhecido como serotonina, pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTR). A serotonina é acetilada pela aralquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) formando a N-acetilserotonina que, por fim, é convertida em N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina pela enzima N-acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), também conhecida como hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT), sendo esta última etapa limitante para a biossíntese da molécula (ZHAO *et al.*, 2019).

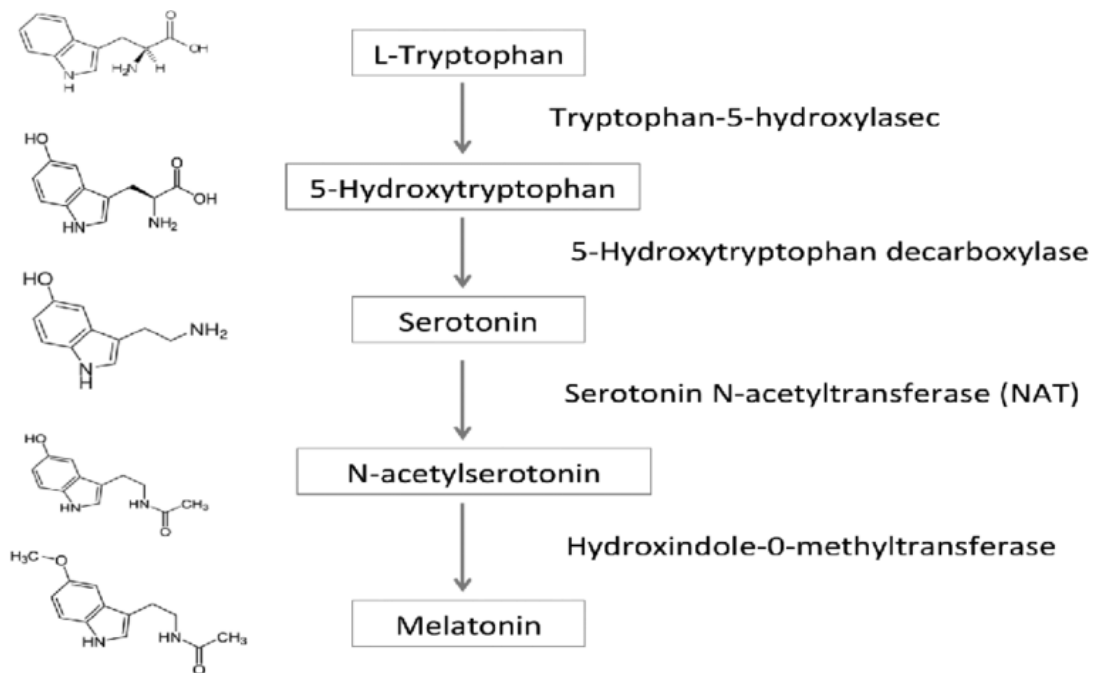


Figura 1. Síntese da melatonina

Adaptado de: Bravo, R., 2013.

Melatonina Pineal

A melatonina pineal, também conhecida como melatonina circulante, atua majoritariamente de forma endócrina e dependente de receptores. Esta é sintetizada pelos pinealócitos, células que compõem a glândula pineal no sistema nervoso central (SNC), e secretada no sangue e fluído cérebro-espinhal. A síntese desse neurohormônio é regulada via núcleo supraquiasmático a partir do fotoestímulo claro/escuro do ciclo circadiano, sendo a presença da luz um inibidor desse processo (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018). De maneira geral, a fotoestimulação é captada pelos fotorreceptores de células ganglionares da retina. Os sinais circadianos são captados e enviados para o núcleo supraquiasmático por neurônios gabaérgicos através do trato retinohipotalâmico e são posteriormente transmitidos para a medula espinal via sistema simpático para os gânglios cervicais posteriores (GCP). Em seguida, os nervos motores pós ganglionares dos GCP liberam catecolaminas como a noraepinefrina (NE) que se ligam ao receptor α e β adrenérgicos (α e β -AR) expressos na membrana dos pinealócitos. A ativação simpática é essencial para a síntese de melatonina uma vez que a produção da enzima arilaquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), também conhecida como serotonina acetiltransferase, é dependente desse fenômeno. O comprimento de luz na faixa do azul,

ou seja, a luz/claridade é responsável por inibir a síntese de melatonina, enquanto a escuridão é responsável por estimular, sendo os maiores picos circulantes dessa molécula durante a noite (SCHOMERUS; KORF, 2005).

A melatonina pineal é amplamente reconhecida como o hormônio do sono atuando como um neurohormônio cronobiótico, responsável pela manutenção do relógio biológico através da regulação do ciclo circadiano. No entanto, essa não é a única atividade exercida por esse hormônio. A melatonina exerce funções pleiotrópicas como a regulação do sono, do balanço energético, regulação metabólica, imunomodulação, bem como proteção celular, que se estende a propriedades anti-tumorais. Mais do que isso, essa indolamina é responsável pela sincronização e adequação dessas funções ao ciclo circadiano e relógio biológico do indivíduo (ZHAO *et al.*, 2019; CIPOLLA-NETO *et al.*, 2014). Por tanto, seus efeitos oscilam durante o espaço de tempo que compreende 24 horas. Os níveis da melatonina podem variar, em média, entre 5 pg/mL durante o dia e alcança o nível de 200 pg/mL durante a noite, turno em que atinge a sua maior concentração circulante (HICKIE; ROGERS, 2011; KARASEK; WINCZYK, 1997). Durante a noites, as altas concentrações dessa indolamina podem permanecer circulantes por cerca de 8 horas, enquanto decresce significativamente durante o dia perdurando por cerca de 16 horas em níveis até 10 vezes inferior ao pico (REITER, 1991).

As modulações de caráter endócrino são desempenhadas a partir da interação da molécula com seus respectivos receptores: receptores nucleares RZR/ROR e os receptores de membrana acopladas à proteína G (MT1 e MT2) (LIU *et al.*, 2016). Os receptores órfãos relacionado ao ácido retinóico (RZR/ ROR) são uma família composta por três subtipos α , β e γ que quando ativados estes receptores, promovem uma sinalização intracelular já foram associadas aos efeitos imunomodulatórios e anti-tumorais da melatonina (WANG *et al.*, 2015b). Entretanto, sabe-se que os principais efeitos associados a esse hormônio são promovidos pela sua interação com os receptores MT1 e MT2. Os receptores MT1 e MT2 são receptores heterotriméricos G_i/Go e $G_q=11$ que dimerizam em homodímeros ou heterodímeros no intuito de manter os sítios de ligação da melatonina funcionais e seletivos a molécula. Estes receptores são expressos na mitocôndria, membrana celular e tecidos (SLOMINSKI *et al.*, 2012). A melatonina também é capaz de se ligar a enzima quinona redutase II, também chamada de MT3 nas quais foram observadas a atividades

pró-apoptótica e citotóxicas em células tumorais quando associada a quimioterápicos (PARIENTE *et al.*, 2017).

Os efeitos mediados por receptores MT1/MT2 podem se diferir a depender dos órgãos alvos, concentração local do hormônio, expressão, afinidade e dessensibilização de receptores. Estes são classificados em três fenômenos: efeitos imediatos, efeitos proximais e efeitos prospectivos. Os efeitos imediatos são observados durante a noite, quando ocorre a máxima de síntese/secreção e interação da melatonina com seu receptor. Os efeitos imediatos são caracterizados pelos papéis endócrinos clássicos desempenhados pela melatonina. Em seguida, são observados os efeitos proximais que ocorre imediatamente após cessar a interação da melatonina com seu receptor, em que se cessa também a sinalização intracelular mediada por essa interação. Nesta fase há a expressão de genes relógios, bem como tradução e degradação dessas proteínas. Os efeitos prospectivos são observados no dia seguinte, durante a claridade, onde há uma drástica redução dos níveis de melatonina circulante (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018).

Melatonina extra pineal

Por outro lado, a melatonina extra pineal é encontrada em diversos tecidos e órgãos externos a glândula pineal como células imunes, endoteliais, cérebro, ovário, pele, retina, trato gastrointestinal (TGI) entre outros. Nestes locais de síntese, a melatonina exerce funções majoritariamente intracrininas, autócrinas, parácrinas, quando dependentes de receptor (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014). No entanto, devido ao seu caráter anfífilico, a melatonina também é capaz de se difundir pela membrana celular, organelas e membranas nucleares desempenhando funções independentes de receptor. São abrangidas neste mecanismo de ação a neutralização de radicais livres e modulação do perfil inflamatório.

Apesar de ser encontrada em uma vasta gama de tecidos e órgãos, a melatonina possui distribuição irregular na célula, apresentando maior abundância na mitocôndria (REITER *et al.*, 2016). A mitocôndria é um dos principais sítios de produção de radicais livres, sendo estes subprodutos da respiração celular. A respiração celular consiste no processo bioquímico de obtenção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Esta ocorre a partir do catabolismo da glicose que ocorre em três etapas: glicólise, ciclo de krebs e fosforilação oxidativa. A glicólise ocorre no citoplasma celular e é caracterizada

pelo processo de degradação da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico para obtenção de duas moléculas de ATP. O ácido pirúvico, ou piruvato, é transportado para a mitocôndria e convertido em acetil-CoA (coenzima A), pelo complexo piruvato desidrogenase (PDC), sendo esta molécula um intermediário do ciclo de krebs. O ciclo de krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste num processo anfibólico, ou seja, que é capaz de promover reações de catabolismo e anabolismo dos substratos envolvidos. Nesta etapa se tem como resultado a oxidação do acetil-coA em CO₂. Além disso, há a obtenção de duas moléculas de ATP, seis moléculas de NADH, duas de FADH₂. As moléculas NADH e FADH₂, por sua vez, são carreadores de elétrons que realizam a transferência de elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE). Por fim, a CTE é composta por uma série de complexos protéicos responsável pela captura de elétron e a conversão do oxigênio (O₂) em água e a geração de ATP (NELSON; COX, 2017).

No entanto, alguns elétrons vazam da CTE e reduzem o O₂ de forma incompleta gerando as espécies reativas de oxigênios (ROS) como subprodutos indesejáveis da respiração. O superóxido (O₂^{•-}) é uma das principais ROS geradas na respiração celular. Este ânion pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em uma reação de autodismutase. O H₂O₂ não é um radical livre, entretanto, por possui vida longa, é capaz de se difundir para outros compartimentos celulares externos à mitocôndria. O peróxido de hidrogênio pode sofrer homólise e gerar o radical hidroxila que é um dos radicais livres mais danoso para o sistema biológico (MURPHY, 2009). Em concentrações moderadas, as ROS e RNS desempenham um importante papel como moléculas de sinalização intracelular e extracelular mediando a regulação de algumas funções celulares atuando na proteção de células contra o estresse oxidativo, manutenção do balanço redox, resposta imune entre outros parâmetros biológicos (ZHANG *et al.*, 2016). Entretanto, em altas concentrações essas moléculas apresentam alta reatividade podendo atuar em macromoléculas promovendo oxidação de enzimas, lipídios e proteínas das membranas celulares, bem como reagir com bases nitrogenadas do DNA. Em casos mais letais, as ROS podem promover mutações no material genético tanto da célula quanto o DNA mitocondrial levando a disfuncionalidades irreparáveis e, por consequência, morte celular (ZHANG *et al.*, 2016).

A N-acetil-5-metoxitriptamina atua no balanço redox através da neutralização de radicais livres como RNS e, em especial, ROS (REITER *et al.*, 2016). A ação antioxidante

da melatonina pode ocorrer de maneira direta ou indireta. Em ação direta, a melatonina interage com gerando intermediários anti-oxidantes. Enquanto em ação indireta, a melatonina é capaz de modular a expressão de enzimas que atuam no balanço redox, promovendo a hiper-regulação e o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (FISCHER *et al.*, 2013). Paralelamente, a melatonina também está associada a uma redução da translocação do fator NF-kB e, assim, redução da produção de citocinas inflamatória (REITER *et al.*, 2000; KUMAR; HALDAR; VERMA, 2021).

Mais do que isso, evidências recentes têm sugerido fortemente que a mitocôndria é o sítio de síntese da melatonina extra pineal (REITER *et al.*, 2021). Sabe-se que esta organela é capaz de expressar a proteína AA-NAT, responsável pela penúltima etapa de síntese da melatonina, além do acetil-CoA, produto da conversão do piruvato na mitocôndria, ser um importante co-fator para a ativação dessa enzima (HICKMAN; KLEIN; DYDA, 1999). Ademais, como mencionado anteriormente, a melatonina é uma molécula altamente conservada entre as espécies. Nesse sentido, uma das explicações que podem justificar a origem da síntese da melatonina nessa organela está contida na Teoria da endossimbiose. Essa teoria propõe que as mitocôndrias seriam originalmente organismos procariotos, no caso bactéria, que foram englobados por organismos heterotróficos em uma relação de simbiose (MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015). Dessa forma, esses organismos mantiveram ao longo da evolução a capacidade da síntese de melatonina como mecanismo adaptativo para manutenção da homeostase celular. Suofu e colaboradores demonstraram que a melatonina é produzida na matriz mitocondrial e exerce função de manutenção da homeostase mitocondrial de forma auto-mitócrica, ou seja, através da interação com receptores MT1 expressos na membrana mitocondrial externa. A sinalização intracelular desencadeada pela interação da melatonina com o seu receptor está associada a inibição do estresse mediado pela liberação do citocromo C e consequente ativação de caspases em células saudáveis (SUOFU *et al.*, 2017). Contudo, pouco se sabe a respeito do mecanismo de regulação da melatonina extra pineal (BISHEHSARI; VOIGT; KESHAVARZIAN, 2020).

Câncer

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer transita entre a primeira e segunda posição no *ranking* de causas de morte em escala global. Apenas

no ano de 2020 foram estimados cerca de 19,3 milhões de novos casos. Nesse mesmo ano, a doença levou a óbito quase 10 milhões de pessoas o que, em termos ilustrativos, corresponderia a causa de 1 em cada 6 mortes no mundo. Destacam-se para a contribuição do crescimento estatístico de incidência os cânceres de mama feminino que compreendem 11.7% dos diagnósticos, seguido pelo câncer de pulmão (11.4%) , colorretal (10%), próstata (7.3%) e estômago (5.6%). Em contrapartida, ao nível de letalidade a lista é liderada pelo câncer de pulmão correspondendo a 18% dos óbitos, seguido pelo colorretal (9.4%), fígado (8,3%), estômago (7.7%) e por fim o câncer de mama feminino (6.9%) (SUNG *et al.*, 2021).

O câncer é definido como um conjunto de mais de 100 doenças malignas caracterizadas pela transformação de células normais em células com uma alta taxa proliferativa e de forma desordenada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Paralelamente, essas células apresentam suas vias de senescência e morte inibidas, tornando-se assim uma célula biologicamente imortal. Tais características compõem um perfil básico de células neoplásicas e são oriundas de mutações genéticas, de caráter somático, em um conjunto de genes considerados críticos ao câncer também denominados oncogenes (GREENMAN *et al.*, 2007). Esse conjunto de genes são responsáveis pela codificação de proteínas que atuam na regulação da via de proliferação, diferenciação e morte celular, além de proteínas associadas a supressão do tumor. Quando mudadas, passam a não exercer adequadamente suas funções promovendo maior susceptibilidade à aquisição de atributos nocivos ao indivíduo. Ademais, essas células adquirem vantagens adaptativas em relação às células não transformadas que as tornam potencialmente agressivas, na qual podem desenvolver a capacidade de migrar e colonizar outros tecidos, ou seja, metastizar (HANAHAN, 2022).

Câncer Gástrico

O câncer gástrico refere-se à neoplasia que se desenvolve na parede de revestimento do estômago. Como mencionado acima, esse tumor ocupa a 5ª posição dentre os tumores mais frequentes no mundo e a 4ª em letalidade. Em termos numéricos, estima-se que no ano de 2020 foram diagnosticados cerca de 1,1 milhões de novos casos e 770 mil mortes provenientes dessa patologia (MORGAN *et al.*, 2022). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) indica que para o triênio de 2020 a 2022 haverão em média 21 mil novos diagnósticos e cerca de 20 mil mortes por grupo de 100 mil

indivíduos (INCA, 2020). Especialistas avaliam que até o ano de 2040, atribua-se ao câncer gástrico cerca de 1,8 milhões de novos diagnósticos e, em média, 1,3 milhões de óbitos anuais (MORGAN *et al.*, 2022).

Os cânceres de estômago podem ser categorizados em carcinomas, tumores estromais gastrointestinais (GISTs), tumores neuroendócrinos (NET), linfomas, sarcomas e entre outros que podem se desenvolver nesse tecido. Os carcinomas são caracterizados como cânceres que se desenvolvem em epitélios teciduais incluindo tecidos glandulares. O subtipo de câncer gástrico mais frequente pertence à classe de tumores glandulares denominado adenocarcinoma. O adenocarcinoma se refere a corresponde por volta de 95% dos casos de cânceres gástricos (INCA, 2021).

A carcinogênese é oriunda da combinação de fatores ambientais e endógenos como pré-disposição genética e/ou acúmulo de alterações genéticas específicas. Dentro dessa linha, classifica-se os fatores de riscos como modificáveis ou não modificáveis. Compõe os fatores de riscos modificáveis os fatores que são passíveis de mudança ou podem ser evitados como hábitos de vida (STEIN; COLDITZ, 2004). À exemplo, padrões alimentares como alto consumo de alimentos preservados em sal, processados, baixo consumo de frutas, legumes e vegetais frescos. Além de condições de sobrepeso ou obesidade, abuso de álcool e tabaco estão intimamente relacionados ao desenvolvimento de tumores. Especificamente para cânceres gástricos, quadros de gastrites, isto é, inflamação do revestimento do estômago, e infecções crônicas pela bactéria *Helicobacter Pylori*, quando não adequadamente tratada, insurgem como os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa patologia. Por outro lado, os fatores de riscos não modificáveis são atribuídos a fatores intrínsecos do indivíduo como sexo, uma vez que esse tumor é mais frequente em homens com idade acima de 60 anos. Além de heranças genéticas que também contribuem para uma pequena porcentagem dos casos de desenvolvimento de cânceres gástricos (ROCK *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2009; SITARZ *et al.*, 2018).

Cânceres gástricos tendem a se desenvolver lentamente ao longo dos anos e raramente apresentam sintomas associados em estágios iniciais o que configura uma grande barreira para o diagnóstico precoce e contribui para a sua evolução. Os tumores podem se iniciar em diferentes porções do estômago e por esta razão promover diferentes sintomas, prognósticos, além de requerer diferentes abordagens terapêuticas. De forma

geral, é característico a esse tipo de neoplasia a expressão de sintomas em estágios avançados, fator preponderante para a sua alta letalidade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021a).

Os tratamentos são traçados a depender do estágio e grau de espalhamento do tumor. Ressecamento cirúrgico compõe a linha de tratamento para tumores diagnosticados precocemente e para aqueles que podem ter apresentado baixo grau de espalhamento, não alcançando tecidos distantes. Ademais, essa abordagem é frequentemente associada a quimioterapia e/ou radioterapia para posterior prevenção de recidivas a partir de células remanescentes. Essa abordagem cirúrgica apresenta melhores chances de sobrevivência a longo prazo. Em casos de tumores não ressecáveis, a quimioterapia e radioterapia compõe as abordagens terapêuticas padrão e podem ser associados a imunoterapias na tentativa de redução tumoral para subsequente remoção cirúrgica ou contenção da progressão tumoral em estágios avançados. Em termos de expectativa de vida, a taxa de sobrevivência relativa em 5 anos, ou seja, porcentagem de pacientes que vivem pelo menos 5 anos após o diagnóstico da doença, abrange cerca de 70% dos indivíduos com tumores localizados, 32% de indivíduos com tumores com grau de espalhamento regional e 6% para indivíduos metastáticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021b).

Estresse Oxidativo, metabolismo e câncer

O estresse oxidativo é o fenômeno resultante do desbalanço entre as espécies reativas produzidas em excesso em relação a uma expressão ineficiente de enzimas antioxidantes para a sua contenção. Como mencionado anteriormente, as ROS exercem papel fundamental na modulação da inflamação e da resposta imune. Essas moléculas são capazes de estimular a expressão de genes inflamatórios através da ativação de fatores de transcrição redox reativos de diversos fatores de transcrição, dentre eles o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (LINGAPPAN, 2018). A ativação do fator de transcrição NF- κ B promove a sua migração do citosol para o núcleo onde há a sua interação com o DNA e, por consequência, a transcrição de diversas citocinas inflamatórias como interleucinas 1, 2 e 6 (IL-1, 2 e 6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que está associada a produção da espécie reativa de nitrogênio (RNS) óxido nítrico (NO) como resposta imune (LIU *et al.*, 2017a). Quando contínuo, o estado

de inflamação está associado ao desenvolvimento de diversas patologias, dentre elas o câncer.

O papel do estresse oxidativo na carcinogênese é dual podendo esta associada a sua supressão mediante indução da senescência e morte celular, bem como desenvolvimento através da indução de mutagênese e/ou dano no material genético celular. Nesse mesmo sentido, o estresse oxidativo agudo pode promover a oxidação de proteínas supressoras de tumor e, por consequência a sua inibição, tal qual promover o aumento da sobrevivência celular (SAKAMOTO *et al.*, 2009; REEST *et al.*, 2018). Em quadros de inflamação crônica estudos têm demonstrado que a comunicação cruzada, isto é o *crosstalk*, entre as ROS derivadas de células mielóides e a citocina pró-inflamatória TNF- α foi capaz de desencadear mutações genéticas tumorigênicas, bem como propiciar um microambiente favorável ao seu crescimento e uma maior invasividade (CANLI *et al.*, 2017).

O crescimento desordenado das células tumorais em tecidos promove a formação de uma massa celular que apresenta em seu interior um ambiente, em teoria, inóspito para as células que ali residem. Com baixa vascularização e baixo acesso a suportes nutricionais e de oxigênio, as células transformadas desenvolveram um mecanismo de vantagem adaptativa a este cenário, a ativação do fator de transcrição induzível por hipóxia 1 (HIF-1). Em especial, a subunidade HIF-1 α , exibe estabilidade e atividade em baixas concentrações de oxigênio, ou seja, hipóxia. A ativação de HIF-1 α está associada a transcrição de diversos genes relacionados a processos como angiogênese com a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metabolismo da glicose através do aumento da expressão de genes glicolíticos, bem como o de transportadores de glicose, além de genes relacionados com a proliferação e sobrevivência celular. O conjunto de modificações obtidas a partir da ativação desse fator conferem às células tumorais as características necessárias para o seu estabelecimento, progressão e agressividade (KE; COSTA, 2006) .

Em um mecanismo aparentemente controverso, células tumorais apresentam como vantagem adaptativa o direcionamento preferencial do metabolismo da glicose para uma via anaeróbica, mesmo em condições de normóxia. Esse fenômeno é denominado efeito warburg ou glicólise aeróbica. A glicólise é um processo bioquímico na qual ao invés de ser transportado para a mitocôndria completando o ciclo de oxidação da glicose

pela fosforilação oxidativa, o piruvato é desviado e convertido em lactato ainda no citoplasma celular. Em tese, esse processo apresenta-se como uma via alternativa ineficiente para a produção de ATP, uma vez apenas 2 moléculas são produzidas nesta via. No entanto, o conjunto de eventos promovidos por este metabolismo promove um microambiente favorável para a manutenção das necessidades celulares do tumor. O metabolismo glicolítico está associado a produção de energia necessária e também de diversos precursores biosintéticos essenciais para suprir a alta demanda proliferativa dessas células. Para tal, há um aumento significativo do consumo de glicose, que paralelamente reduz a biodisponibilidade desse substrato para as células adjacentes incluindo células imunes influenciando diretamente no seu perfil de ativação (LIBERTI; LOCASALE, 2016). Para além, é induzida a acidose do microambiente, oriunda da alta produção de lactato, que contribui para a modulação do perfil imune em um perfil mais anti-inflamatório, seleção de células resistentes, apoptose e quimioterapia contribuindo para evasão e maior agressividade tumoral (LIU; JIN; FAN, 2021).

Ademais, hipotetiza-se que o metabolismo glicolítico possa promover a inibição da síntese de melatonina em células tumorais. Como mencionado anteriormente, a fosforilação oxidativa é a principal via de obtenção de energia em células saudáveis. O transporte e conversão do piruvato para a mitocôndria configura eventos-chave para a síntese de melatonina, uma vez que o acetil-coA é um co-fator necessário para a síntese da enzima limitante AANAT. Nesse sentido, o metabolismo glicolítico atua no aumento da expressão da enzima piruvato quinase desidrogenase (PDK). As PDK promovem a inibição do complexo piruvato desidrogenase (PDC), conjunto de enzimas responsável pela conversão do piruvato em acetil-coA, dessa forma, inibindo a síntese de melatonina e o fornecimento de substrato para o funcionamento da fosforilação oxidativa (Figura 2) (REITER *et al.*, 2020).

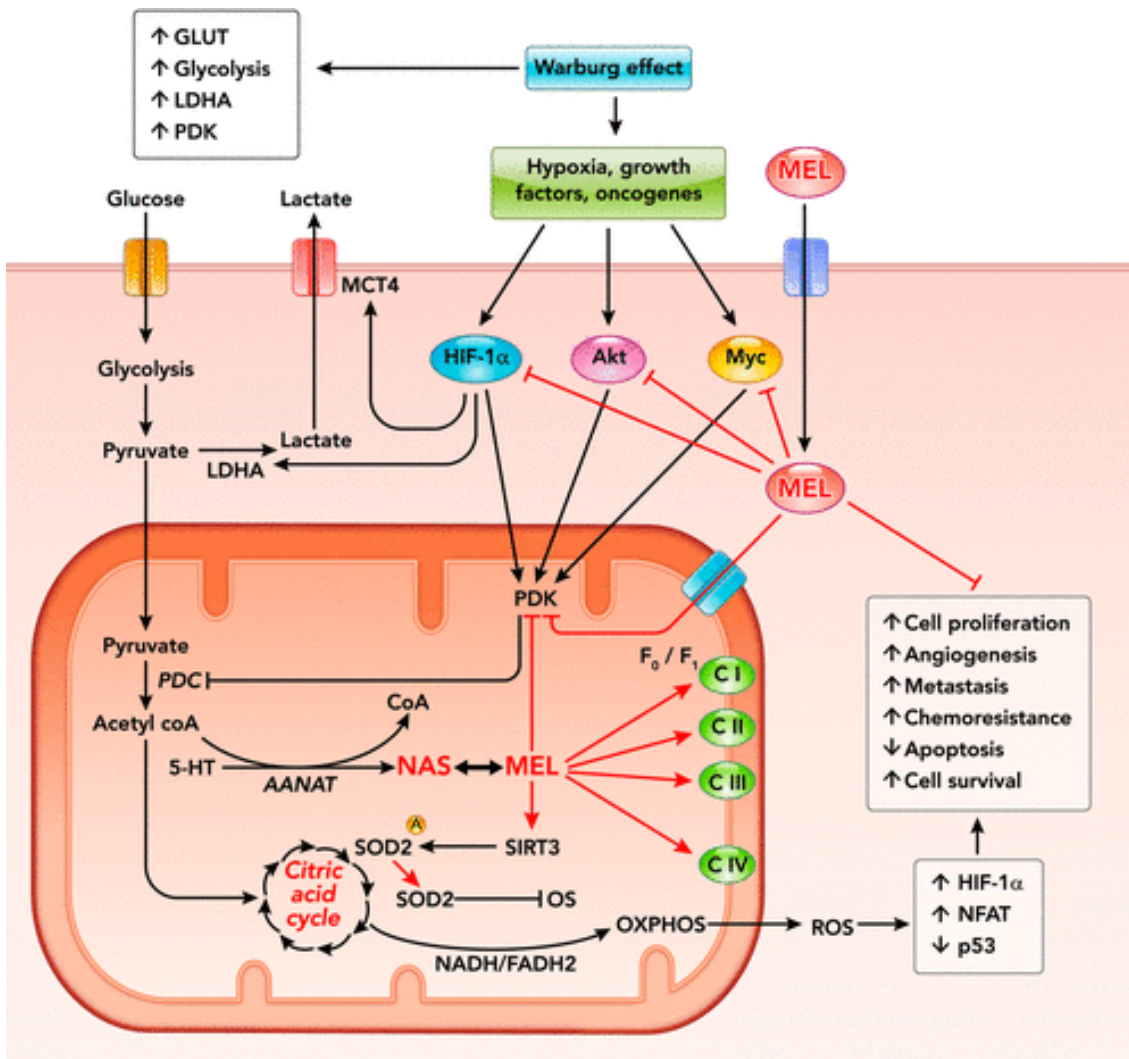


Figura 2. Síntese de melatonina na mitocôndria e metabolismo celular.

Adaptado: Reiter R.J., 2020.

Morte celular

Em especial, um dos principais entraves atribuídos às perturbações promovidas pelas células tumorais no sistema biológico é a sua imortalidade. Desprezando a rica complexibilidade e relevância de outros pilares para a tumorigênese, em tese, a alta taxa proliferativa poderia ser contornada caso houvesse um balanço proporcional em número e rapidez da morte dessas células transformadas. A morte é caracterizada como um processo de manutenção da homeostase celular através da eliminação de células indesejadas. Devido a sua importância na regulação da vida, diversos mecanismos de morte foram desenvolvidos com o intuito de atender as mais variadas necessidades celulares e/ou teciduais. Os diferentes tipos de morte acionam respostas específicas que

estão intimamente ligadas ao desencadeamento de processos secundários. Estes, darão continuidade à conservação do ciclo de sobrevivência e proliferação a depender do requerimento do microambiente (CHAABANE *et al.*, 2013).

As mortes celulares são categorizadas em duas classes principais: a morte celular regulada e a morte celular accidental. A morte celular regulada, também chamada de morte celular programada, é caracterizada por um processo finamente coordenado que tem por finalidade a manutenção da homeostase em condições normais ou a contenção de quadros nocivos/patológicos. Enquanto a morte celular accidental é desencadeada por danos de caráter físico, químico ou mecânico. De modo geral, as mortes celulares reguladas apresentam um amplo espectro de perfis com particularidades que as caracterizam como mecanismos de indução, padrões moleculares, características morfológicas e de resposta produzida como por exemplo imunomodulação (GALLUZZI *et al.*, 2018).

Os tipos de morte predominante no sistema biológico pertencem à classe das mortes celulares programadas, em especial a apoptose. A apoptose é um tipo de morte não inflamatória morfológicamente caracterizada pela diminuição do citoplasma celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de bolhas membranares, compartimentalização do conteúdo intracelular em corpos apoptóticos, além da externalização do fosfolípido de membrana fosfatidil serina. A indução da morte apoptótica pode ser desencadeada por sinalização extrínseca ou intrínseca. Independente da via de indução tipicamente obtém-se a ativação de proteases aspárticas de cisteínas, isto é, caspases. A ativação através da extrínseca é promovida por estímulos/perturbações extracelulares mediada pela interação dos receptores de mortes expressos na superfície celular como receptor de fator de necrose tumoral (TNFR), Fas (Apo-1/CD95) e receptor do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) com seus ligantes cognatos. Após a interação é suscitado a montagem de um dinâmico complexo multiproteico que promove a clivagem da forma inativa de caspase-8 em sua forma ativa permitindo a sua atuação na ativação de outras caspase efetoras (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

A via intrínseca, por sua vez, é desencadeada em resposta a condições de estresse celular como privação de nutrientes, dano do DNA, hipóxia entre outros. A via apoptótica intrínseca é caracterizada pela permeabilização da membrana mitocondrial externa na qual é regulada pela família de proteínas pró e anti-apoptóticas BCL-2. Em resposta à

estímulos apoptóticos, a proteína X associada a BCL2 (BAX) e/ou a proteína antagonista de BCL2 (BAK) promovem a formação de poros na membrana mitocondrial e, por conseguinte, a liberação do citocromo C. O citocromo C atua então na formação de apoptossomos e maturação da caspase-9 que darão prosseguimento ao processo de morte (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019; GALLUZZI *et al.*, 2018). É importante ressaltar que a via intrínseca pode ocorrer de forma independente de caspase a partir da liberação do fator indutor de apoptose e da endonuclease G da mitocôndria. Após sua liberação, essas proteínas migram para o núcleo onde promovem a condensação da cromatina (CHAABANE *et al.*, 2013).

Por outro lado, contrariamente a morte apoptótica, outras vertentes de mortes apresentam como principais características a lise celular e a indução de imunogenicidade mediada por inflamação. A princípio postulava-se que mortes líticas estariam associadas a um processo de morte acidental, biologicamente não controlada ou programada, sendo a morte necrótica a principal referência dessa classe. A necrose é morfologicamente caracterizada pelo inchaço citoplasmático, bem como de organelas seguido pela ruptura da membrana plasmática e, conseqüente, extravasamento do conteúdo intracelular para o espaço extracelular. O extravasamento do conteúdo intracelular é responsável por desencadear o recrutamento imune. Um dos processos inflamatórios característicos de morte lítica é a translocação da proteína de alta mobilidade HMGB1 do núcleo para o citoplasma e sua posterior liberação para o meio extra celular (ROVERE-QUERINI *et al.*, 2004; FINK; COOKSON, 2005). Esse perfil de morte é frequentemente observado em condições de insulto celular ou tecidual como choque osmótico, estresse mecânico, processos de congelamento e descongelamento, altas temperaturas, hipóxia e altas concentrações de peróxido de hidrogênio (BERGHE *et al.*, 2013).

No entanto, sabe-se hoje que mortes líticas podem ser performadas de forma finamente controlada como a morte piroptótica. A piroptose pertence à classe de mortes programadas altamente inflamatórias e tem ganhado grande destaque dentro do contexto tumoral. Atualmente, as estratégias terapêuticas visam não apenas a indução da morte de células tumorais por terapias convencionais, mas também o recrutamento de células imunes para reconhecimento e eliminação dessas células. Dessa forma, pode ser estabelecido também um controle interno efetivo para reconhecimento de células remanescentes e, a longo prazo, o controle de possíveis rescindências (TAN *et al.*, 2021).

A piroptose pertence à classe de mortes programadas de caráter lítico e, por consequência, altamente inflamatório (fig.3) (GALLUZZI *et al.*, 2018). Quanto aos aspectos morfológicos que caracterizam esse processo, compartilha-se com a apoptose alguns aspectos como a condensação da cromatina e formação de bolhas membranares. No entanto, difere-se em aspectos como o inchaço celular e a característica formação de poros na membrana responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-18 e IL-1 β .

Atualmente são descritas duas vias de ativação da piroptose: a canônica e a não canônica. A via canônica é induzida quando há o reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) endógenos, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) exógenos por proteínas sensoras intracelulares, isto é, receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A família de PRR é composta por receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo NOD (NLR) e receptor do tipo ausente em melanoma (AIM) (FANG *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2021). A ativação dos receptores promove uma sinalização para a montagem do complexo multiproteico denominado inflamassoma, sendo o melhor descrito o NLRP3. Quando ativo, o receptor NLRP3 realiza o recrutamento da proteína adaptadora ASC e da enzima inativa pró-caspase 1. A pró-caspase 1, então, realiza a sua autoclivagem passando a assumir a sua conformação ativa, a agora caspase 1. A caspase 1 é responsável pela clivagem da proteína Gasdermina D (GSDMD) que quando clivada expõe a sua porção N-terminal. Essa porção interage com cardiolipinas e fosfatidilinosítídeos da face interna da membrana plasmática, oligomerizando-se e formando poros não seletivos de aproximadamente 15 nanômetros de diâmetro. Além da clivagem da GSDMD, a caspase 1 também realiza a clivagem das citocinas inflamatórias pró-IL-1 β e pró-IL-18 em sua conformação ativa: IL-1 β , IL-18 que são secretadas através dos poros promovendo inflamação. Para mais, há também a secreção da enzima lactato desidrogenase (LDH) que também está associada ao processo inflamatório (TAN *et al.*, 2021).

Em humanos, A via não canônica é iniciada pela ativação das caspases 4 e 5. A ativação dessa via é desencadeada através do reconhecimento intracelular de lipopolissacarídeos de membrana (LPS) de bactérias gram negativas pelas caspases na sua forma inativa. Após o reconhecimento, há a interação direta entre o domínio CARD das pró-caspases 4 e 5 e o lipídeo A do LPS. Em seguida, com a montagem do

inflamassoma e a autoclivagem das caspases em sua forma ativa, há a clivagem e oligomerização da GSDMD, bem como a maturação e secreção das citocinas IL-1 β , IL-18 e secreção de LDH (DOWNS *et al.*, 2020).

O papel da piroptose no câncer é dual podendo ser associado a um perfil pró ou anti-tumoral a depender do tipo e particularidades do tumor. Em patologias gástricas, essa morte pode ser desencadeada em resposta à infecção por *H. pylori* e em resposta a quimioterapia (ZHANG *et al.*, 2021). Especificamente em cânceres gástricos, foi observada uma diminuição da expressão de proteína GSDMD em comparação às células não cancerosas. Como resultado dessa modulação, foi observado a ativação de vias e proteínas associadas ao ciclo celular que promoveram o aceleração da transição da fase S para G2 nessas células, estando associada a sua alta proliferação (WANG *et al.*, 2018). Para além disso, Shao e colaboradores apresentaram um possível novo método prognóstico de cânceres gástricos baseado na expressão de gene reguladores relacionados à piroptose, demonstrando a relevância desse perfil de morte no campo terapêutico anti-neoplásico (ZHANG *et al.*, 2021).

A melatonina tem emergido como um promissor coadjuvante terapêutico anti-tumoral, demonstrando exercer funções oncostáticas e anti-angiogênica em diversas linhagens tumorais. Além disso, uma importante função da melatonina é seu papel sobre a modulação da morte celular, sendo uma importante indutora de apoptose. Em paralelo, a literatura tem apresentado diversas evidências de que a melatonina é capaz de modular a piroptose em diversos tipos celulares não tumorais, entretanto, pouco se sabe sobre o papel da melatonina sobre a modulação da piroptose em células tumorais. Tendo isto em vista, o objetivo do presente trabalho é avaliar o papel da melatonina na modulação dos parâmetros carcinogênicos, bem como indução dos diferentes perfis de morte de células de câncer gástrico AGS.

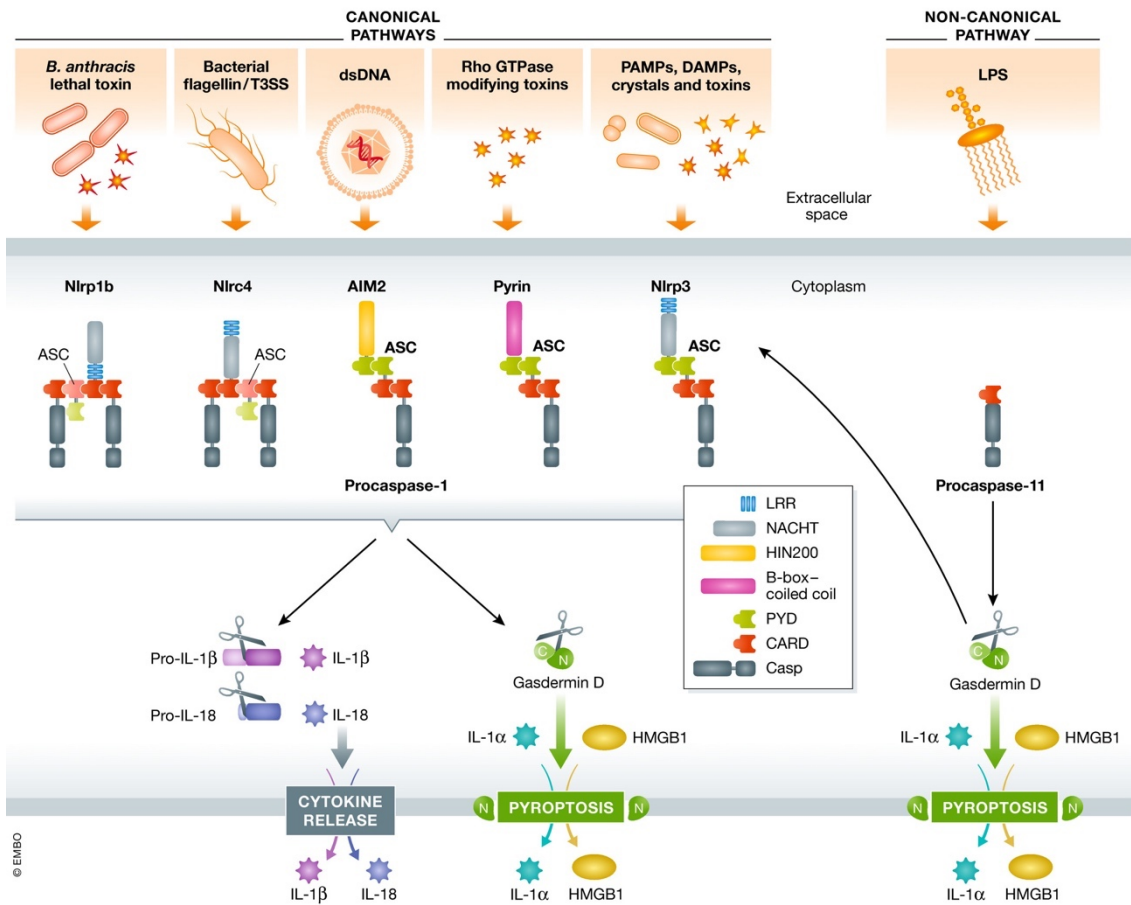


Figura 3. Mecanismos de ativação da piroptose

Adaptado Van Gorp H., 2019.

2. Justificativa

Em 2021, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) regulamentou o uso da melatonina e de suplementos alimentares contendo esta substância em concentração máxima de 0,21 mg por dia. Os produtos destinam-se exclusivamente para indivíduos com idade igual ou superior a 19 anos, conforme a instrução normativa IN 28/2018 (ANVISA, 2018). No entanto, observa-se crescente comercialização de produtos em doses quase 50 vezes superiores ao regulamentado. No mercado digital, é possível encontrar a comercialização da melatonina como agente terapêutico em concentrações entre 1 e 10 mg estimulando a prática do uso indiscriminado do “hormônio do sono” sem prescrição médica.

As propriedades pleiotrópicas da melatonina conferem a esse hormônio alta capacidade modulatória que excedem a regulação do sono como imunomodulação, regulação do balanço energético, tolerância glicêmica, habilidades motoras intestinais, perfil inflamatório entre outros. O uso indiscriminado da melatonina burla avaliações de saúde, bem como patologias, que podem sofrer com as inúmeras alterações mediadas pela dosagem inespecífica e exponencialmente maior que as concentrações fisiológicas do hormônio (ANVISA, 2022).

No contexto tumoral, a melatonina tem sido amplamente investigada como adjuvante terapêutico associado ao um papel oncostático, intensificador da efetividade, bem como atenuador da citotoxicidade de quimioterápicos (MA *et al.*, 2016). Contudo, pouco se sabe a respeito da ação da melatonina especificamente sobre parâmetros celulares e indução de morte de células de câncer gástrico. Este trabalho visou analisar o papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer gástrico humano AGS, bem como identificar e caracterizar se há a ocorrência de morte piroptótica mediada pelo estímulo com melatonina *in vitro*.

3. Objetivo Geral

Avaliar o papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de câncer gástrico humano AGS, bem como na indução de morte celular por piroptose *in vitro*.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Avaliar a citotoxicidade da melatonina sobre a viabilidade mitocondrial de células de câncer gástrico AGS;

3.1.2 Analisar o papel da melatonina na proliferação e progressão do ciclo celular de células de câncer gástrico AGS;

3.1.3 Avaliar o papel da melatonina na fragmentação nuclear induzida pela melatonina em células de câncer gástrico AGS;

3.1.4 Analisar o papel da melatonina na modulação de biogênese de corpúsculos lipídicos em células de câncer gástrico AGS;

3.1.5 Analisar o papel da melatonina na modulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de câncer gástrico AGS;

3.1.6 Avaliar o papel da melatonina na respiração celular de células de câncer gástrico AGS;

3.1.7 Avaliar o papel da melatonina na secreção de citocinas inflamatórias em células de câncer gástrico AGS;

3.1.8 Analisar dinâmica e função mitocondrial em células de câncer gástrico AGS após estímulo com melatonina;

3.1.9 Analisar e caracterizar o perfil de morte induzida pela melatonina em células de câncer gástrico AGS;

3.1.10 Avaliar o papel da melatonina na liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelas células de câncer gástrico AGS;

3.1.11 Analisar o papel da melatonina na expressão pró-caspase-1 e de gasdermina D;

3.1.12 Avaliar o papel da melatonina na modulação da formação de poros membranares em células de câncer gástrico AGS;

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultivo e estímulo celular

4.1.1 Cultivo celular

AGS: Linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano extraído em 1979 de paciente feminina, caucasiana, de 54 anos de idade (ATCC AGS). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina, adquiridos pela Sigma Aldrich, e mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

4.1.2 Estímulo

Para as análises comparativas dos experimentos foram utilizadas as seguintes condições:

Células AGS cultivadas apenas com meio de cultura suplementado, denominada UNS, foram mantidas pelo período de 24, 48 e/ou 72 horas em incubação na estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Células AGS estimuladas com as diferentes concentrações de melatonina: 0.625, 1.25, 2.5, 3.75 e 5mM adicionadas ao meio de cultura suplementado.

As células AGS estimuladas foram expostas a melatonina através da adição da solução de melatonina, na concentração estoque de 500mM disperso em etanol puro no meio de cultura DMEM. A concentração estoque final foi determinada a fim de se obter uma concentração final de veículo, igual ou inferior a 2% do volume final do meio de cultura, que seja incapaz de promover efeitos citotóxicos a célula. Para melhor solubilização da melatonina em etanol foi realizado a sonicação da solução de melatonina em etanol por 5 min em temperatura ambiente. Após o processo de sonicagem, foi adicionado os respectivos volumes a fim de se obter as concentrações finais de 0.625, 1.25, 2.5, 3.75 e 5mM e as células estimuladas foram mantidas pelo período de 24, 48 e/ou 72 horas em incubação na estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.2. Ensaio de viabilidade mitocondrial por MTT

As células AGS foram plaqueadas em placas de 96 poço (n=5) com densidade celular de 1×10^4 células por poço. Após 24, 48 e 72 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 0.625, 1.25, 2.5, 3.75 e 5mM, a viabilidade mitocondrial foi avaliada através do ensaio de MTT. Este é um ensaio colorimétrico que consiste na análise de citotoxicidade baseada na capacidade de enzima oxidoredutases dependentes de NADPH mitocondriais realizarem a redução do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) em cristais de formazan que apresentam uma coloração arroxeada. O sobrenadante celular foi descartado e em seguida foi adicionado o MTT (Thermo Fisher 5mg/mL) na concentração final de 10% em meio DMEM sem SFB. As células com a solução de 10% de MTT foram incubadas em estufa à 37C e 5% de CO₂ por 1h e 30 min. Finalizado o tempo de incubação, a solução de MTT foi descartada e foi adicionado 100µL de DMSO para dissolução dos cristais de Formazam. A leitura foi realizada utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3* à 570nm. A análise de dados foi realizada através do software *GraphPad Prism*, utilizando a média do valor da absorbância das células não estimuladas (UNS) como 100% de viabilidade e as porcentagens das demais condições são obtidas individualmente em proporção a essa média. Para controle experimental foi utilizado o agente citotóxico Dimetilsulfóxido (DMSO).

4.3 Análise da proliferação por CFSE

As células AGS foram plaqueadas em placas de 24 poço (n=3) com densidade celular de 1×10^5 células por poço. Anteriormente aos estímulos, as células foram marcadas com a sonda CFSE (Thermo Fisher), na concentração de 5µM em meio sem SFB e incubadas por 15min à temperatura ambiente. Após incubação, foi feita a etapa de bloqueio por 5min com SFB puro, seguida de uma lavagem com PBS. Os estímulos com melatonina foram realizados na concentração de 0.625, 2.5 e 5mM pelo período de 24, 48 e 72 horas. O CFSE é uma sonda que após interagir com a aminas biogênicas emite fluorescência. No entanto, ao passo que célula entra em processo de divisão celular, a fluorescência é proporcionalmente dividida com as células filhas de modo que uma menor fluorescência é um indicativo de maior proliferação. Após o tempo de estímulo as células foram coletadas e ressuspensas em PBS. A leitura das células foi realizada por citometria de

fluxo (BD FASCCalibur) em canal FL-1. Foram analisados 1×10^4 eventos. Os dados obtidos analisados pelo software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.4 Análise do ciclo celular por Iodeto de propídio

As células AGS foram plaqueadas em placas de 12 poço (n=5) com densidade celular de 5×10^5 células por poço. Após 24, 48 e 72 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 0.625, 2.5 e 5mM as células foram desaderidas e fixadas com etanol 70% (v/v) por 2 horas. Em seguida, as mesmas foram suspensas em 50µl de solução de PI, composta de: 0.1% de citrato de sódio (v/v), 0.1% Triton-X (v/v), 20µg/ml de PI, 50µg/ml de RNase, diluídos em PBS. Após incubação de 30min à temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas em PBS. A leitura das células foi realizada por citometria de fluxo (BD FASCCalibur). Foram analisados 5×10^4 eventos. Os dados obtidos analisados pelo software FlowJo.

4.5 Análise da fragmentação nuclear por PI

As células AGS foram plaqueadas em placas de 12 poço (n=5) com densidade celular de 5×10^5 células por poço. Após 24, 48 e 72 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 0.625, 2.5 e 5mM as células foram desaderidas e fixadas com etanol 70% (v/v) por 2 horas. Em seguida, as mesmas foram suspensas em 50µl de solução de PI, composta de: 0.1% de citrato de sódio (v/v), 0.1% Triton-X (v/v), 20µg/ml de PI, 50µg/ml de RNase, diluídos em PBS. Após incubação de 30min à temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas em PBS. A leitura das células foi realizada por citometria de fluxo (BD FASCCalibur). Foram analisados 5×10^4 eventos. Os dados obtidos analisados pelo software FlowJo.

4.6 Biogênese de corpúsculo lipídico por Bodipy

As células AGS foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3), com densidade celular de 1×10^5 células por poço. Após estímulo com a melatonina por 24 e 48 horas nas concentrações de 2.5 e 5mM, as células foram marcadas através da sonda lipofílica fluorescente Bodipy 493/503 (Life Technologies) que se liga a lipídeos neutros presentes nos corpúsculos lipídicos (CLs). A sonda foi diluída em PBS na proporção de 1:5000 e as células permaneceram incubando com a sonda por 30 min à 4C para

marcação. Após a incubação as células foram lavadas com PBS duas vezes e posteriormente ressuspensas em 400 µL de paraformaldeído 1X para fixação. A leitura da marcação celular foi realizada por citometria de fluxo (BD FASCCalibur) em canal FL-1. Foram analisados 1×10^4 eventos. Os dados obtidos analisados pelo software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.7 Análise de espécies reativas intracelulares

Análise cinética: As células AGS foram plaqueadas em placa de 96 poços com bordas laterais preta (n=5), com densidade de 1×10^4 de células por poço. As células foram marcadas com DCF-DA na concentração de 4µM por 45 min e em seguida lavadas 2x com PBS e estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5, 5mM. O peróxido de hidrogênio na concentração de 600µM foi utilizado como controle positivo. Em seguida, a placa foi colocada para leitura por 6 horas no espectrofotômetro SpectraMax M3 nos comprimentos de 485 nm de excitação e de 535 nm de emissão.

Análise pontual: As células AGS foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3), com densidade celular de 1×10^5 células por poço. Após estímulo com a melatonina por 24 horas nas concentrações de 2.5 e 5mM, as células foram desaderidas e marcadas por 30min com a sonda DCF-DA (Sigma-Aldrich), na concentração de 4µM. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em PBS para leitura. A leitura da marcação celular foi realizada por espectrofotometria para a análise cinética e citometria de fluxo (BD FASCCalibur) para a análise pontual. Foram analisados 1×10^4 eventos. Os dados obtidos analisados pelo software FlowJo

4.9 Dosagem de Glutathiona

As células AGS foram plaqueadas em placas de 6 poços (n=3), com densidade celular de 1×10^6 células por poço. Após estímulo com a melatonina por 24 horas na concentração de 2.5, as células foram congeladas à -80°C. As amostras de células AGS congeladas foram descongeladas no gelo e lisadas em 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 0,1% Triton X-100. A lise foi realizada através de 3 ciclos de: 30 segundos de vórtex; 1 minuto em banho ultrassônico gelado; congelando a -80 ° C e descongelando no gelo. Então, o lisado era centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 min a 4 ° C. O pellet de proteínas foi armazenado para proteínas quantificação, enquanto o sobrenadante foi coletado, colocado

em gelo e imediatamente usado para a determinação da glutatona total (TGSH = GSH + GSSG) e a glutatona dissulfeto (GSSG). Os níveis foram determinados usando o método de reciclagem enzimática (Tietze, 1969) adaptado para microplacas (Rahman et al. 2006). Para medição de TGSH, 5 µl de sobrenadante foram adicionados a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio de 125 mM (pH 7,2), 0,5 U/ml Glutatona redutase (GR), 0,2 mM 5,5'-dithio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e 0,25 mM NADPH em triplicado. Em seguida, a absorbância a 412 nm foi monitorada por 90 segundos. Para medição de GSSG, 15 µl de sobrenadante foram neutralizados com 45 µl de potássio 0,5 M tampão fosfato (pH 7,4) antes da derivatização com 25 mM de 2-vinilpiridina por 1 hora. Depois da incubação, o sobrenadante neutralizado foi misturado com um meio de reação contendo 125 mM tampão de fosfato de potássio (pH 7,2), 1,4 U/ml GR, 0,5 mM DTNB e 0,25 mM NADPH em triplicado. Em seguida, a absorbância a 412 nm foi monitorada por 90 s. As taxas de mudança na absorbância a 412 nm (412 /min) das amostras foi comparada à de Curvas padrão construídas com GSH (0,25-4 µM) e GSSG (10-320 nM) para TGSH e GSSG medição, respectivamente. Para medir os níveis de proteína nos lisados e normalizar os níveis de glutatona, 80 µl de NaOH 100 mM foram adicionados ao sedimento de proteínas e misturado até solubilização completa. Então, os níveis de proteína foram determinados usando coomassie brilhante azul G usando o ensaio de Bradford (Bradford, 1976) com Modificações (Ernst e Zor, 2010). A albumina de soro bovino diluída em 100 mM de NaOH foi usado como padrão de proteína.

4.8 Respirimetria de Alta resolução

As células AGS foram plaqueadas em placas de 6 poços (n=6), com densidade celular de 1×10^6 células por poço. Após 24 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5 mM as células foram suspensas em um total de 2.2 ml de DMEM sem SFB. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada usando um respirômetro de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k), a 37°C, em agitação contínua à 750 rpm. Ao longo da corrida os seguintes inibidores da cadeia transportadora de elétrons (CTE) foram adicionados: o inibidor da ATP sintase oligomicina (OMY) na concentração de 1.25 µM, o desacoplador da CTE CCCP em pulsos de 100 nM e o inibidor do complexo III Antimicina A na concentração de 2.5 µM. Frente aos estímulos, foi analisado o consumo de oxigênio residual (ROX).

4.9 Detecção de mitocôndrias por microscopia confocal

As células AGS foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=2), contendo lamínula para microscopia, em uma densidade celular de 5×10^4 células por poço. Após 48 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM, as mitocôndrias das células viáveis foram marcadas, por 45 minutos à 37°C, com a sonda MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher), na concentração de 100nM, diluída em meio sem SFB. Após a marcação, as células foram lavadas 3x com PBS e fixadas com formalina 3.7% por 15 minutos. Posteriormente, as células tiveram seu núcleo marcado com a sonda DAPI, diluída em PBS (1:1000), incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e lavadas com PBS após a marcação. As amostras foram analisadas pelo microscópio de fluorescência Confocal Image System (Leica Microsystem) e a quantificação da intensidade de fluorescência feita através do software ImageJ.

4.10 Análise do perfil inflamatório por ELISA

A dosagem das citocinas foi realizada com sobrenadantes obtidos do cultivo de células AGS estimuladas com melatonina na concentração de 2.5 e 5mM pelo período de 24 e 48 horas. A secreção das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e do fator de crescimento VEGF foi realizada através da técnica de ELISA utilizando os kits comerciais da BD Biosciences e R&D systems, seguindo as especificações dos protocolos disponibilizados pelo fabricante. A leitura foi realizada através do espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices) à 450nm. As concentrações das citocinas foram calculadas com base nas suas respectivas curvas padrão e os valores absolutos foram plotados em pg/ml.

4.11 Análise dos perfis de morte celular por Anexina-PI

As células AGS foram plaqueadas em placas de 24 poço (n=3) com densidade celular de 1×10^5 células por poço. Após 24, 48 e 72 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 0.625, 2.5 e 5mM os perfis de morte foram caracterizados através da marcação com as sondas Anexina-V FITC (BD Bioscience) e Iodeto de Propídio na concentração de 50 μ g/mL (PI- Sigma-Aldrich). A caracterização ocorre através da interação da Anexina V com o fosfolípido fosfatidilserina, o qual é apresentado na face externa em membranas de células apoptóticas. O Iodeto de propídeo, por sua vez, é uma sonda impermeável a membranas celulares que fluoresce a partir da interação com ácidos

nucléicos. A sua fluorescência indica perda da integridade de membrana plasmática sendo indicativo de morte lítica. Após tratamento, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) uma vez, coletadas através do uso de Tripsina/EDTA e transferidas para tubos falcons onde receberam a marcação com a adição de 100µl de tampão de ligação 1 X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl₂), 2 µL de Anexina V-FITC (quatroG) e 2 µL de iodeto de propídeo (quatroG) por 15 min à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após incubação, as amostras foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em *Binding Buffer*. A leitura foi realizada por citometria de fluxo (BD FASCCalibur) utilizando os canais FL-1 e FL-3. Foram analisados 1x10⁴ eventos. Os dados obtidos analisados pelo software *FlowJo V10* (Tree Star Inc). Como controle experimental foram usadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos

4.12 Dosagem da liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

A dosagem da liberação de LDH foi realizada com sobrenadantes frescos obtidos do cultivo de células AGS estimuladas com melatonina na concentração de 2.5 e 5mM pelo período de 24, 48 e 72 horas. Foi utilizado o kit comercial Invitrogen e a execução do ensaio foi realizado segundo as especificações do protocolo disponibilizado pelo fabricante. A leitura foi realizada através do espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices) à 490nm.

4.13 Análise da expressão de proteínas Pro-Caspase 1 e Gasdermina D por Western Blotting

As células AGS foram plaqueadas em placas de 6 poços (n=1) com densidade celular de 1x10⁶ células por poço. Após 24 e 48 horas de estímulo com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM as células foram lavadas uma vez com PBS 1x e as proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise celular (Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM e Triton X-100 1%- pH 7.4, acrescido de inibidor de protease) e auxílio de raspador de células. Após a desaderência e transferência para um eppendorf, as células foram centrifugadas à 17000 g por 15 minutos para o processo de clarificação. Em seguida o sobrenadante foi coletado e submetido a quantificação.

A quantificação de proteínas foi realizada através do método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). 50 µg de proteína total foram expostos à solução precipitadora

(Clorofórmio 1:4 metanol), intensamente agitados, centrifugadas à 10000 G por 10 minutos à 4°C. Após a centrifugação, a solução precipitadora foi descartada e adicionado a mesma quantidade de metanol anteriormente acrescido. As proteínas foram submetidas a uma nova centrifugação à 10000 G por 10 minutos à 4°C, o metanol foi descartado e as proteínas precipitadas foram colocadas em estufa para completa secagem do líquido remanescente.

As proteínas precipitadas foram ressuspensas em tampão de amostra 1X (Tris 125mM, 20 % glicerol, 5 % 2- mercaptoetanol, 4 % de SDS e 0,004 % azul de bromofenol), fervidas por 5 minutos à 100 °C e logo em seguida aplicadas em géis de poliacrilamida com concentração de 12 %. As amostras correram em tampão Tris-Glicina (Tris 25mM, Glicina 192mM, 1% SDS – pH 8,3) a 120 V por 2 horas à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose utilizando sistema *semi-dry* em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, 20 % metanol – pH 8,3) por 15 minutos a 15 V. A seguir, as membranas foram bloqueadas por 1 hora utilizando solução de bloqueio (5 % leite desnatado em 50mM Tris, 150mM NaCl – pH 7,4, 0.05% Tween 20). As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Bax (B3428 – Sigma Aldrich) diluído 1/500 em solução de TBS (50 mM Tris, 150mM NaCl – pH 7,4) *overnight* em agitação a 4 °C. Em seguida as membranas foram lavadas em solução TBS/T (50mM Tris, 150mM NaCl – pH 7,4, 0.05% (v/v) Tween 20) por três vezes em agitação de 5 minutos entre cada lavagem a 4

°C, e então foram incubadas com anticorpo anti-rabbit (GE Healthcare) diluído 1/10000 em solução TBS por 1 hora a 4 °C. Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com proporções iguais de solução para revelação.

A obtenção de imagens foi realizada através do software ImageQuant e a análise da densitometria das bandas relativas às proteínas Pro caspase Caspase 1, Gasdermina D e foi realizada com normalização para bandas de β actina (A3854, Sigma Aldrich). A quantificação relativa de bandas realizada através do software *ImageJ*.

4.14 Ensaio de formação de poros na membrana plasmática

As células AGS foram plaqueadas em placas de 96 poço (n=5) com densidade celular de 1×10^4 células por poço. Para a avaliação da formação de poros mediada por LPS/ATP,

as células AGS foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10µg/mL por 24 horas e posteriormente com ATP na concentração de 5mM por 45 minutos. Após estímulo, então foram expostas ao Iodeto de propídeo (PI) na concentração de 6 µg/mL. Para avaliação do papel da melatonina na modulação da formação de poros induzida por LPS/ATP foram analisadas 3 condições: pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento com melatonina após o estímulo anterior. O pré tratamento foi realizado através do estímulo prévio com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM por 1 hora antes do estímulo com LPS/ATP, sendo retirada antes da introdução dos novos estímulos. O co-tratamento foi realizado através da presença da melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM durante o estímulo com LPS/ATP e retirada dos estímulos anteriormente a exposição ao PI. Por fim, o pós-tratamento foi realizado após estímulo e retirada do LPS/ATP, na qual foi preparada uma solução de melatonina com PI em que as células ficaram em exposição contínua a melatonina até o fim do experimento. Para todas as análises, após exposição ao PI, as células foram imediatamente lidas no espectrofotômetro Spectramax por 8 horas em intervalos de 20 minutos entre as leituras. A fluorescência foi analisada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 538 nm e de 617 nm de emissão. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism.

4.15 Análise estatística e confecção de gráficos

Para análises estatísticas foram realizados teste de normalidade para análise da distribuição normal das amostras através do teste Shapiro-Wilk. Para dados com distribuição normal, ou seja, paramétricos foi utilizado o teste one-way ANOVA e o pós-teste de Tukey. Para os testes que não apresentam distribuição normal, não paramétricos, foram utilizados o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados através *GraphPad Prism* 8.0.

5. Resultados

5.1 A melatonina reduziu a viabilidade celular mitocondrial de células de câncer gástrico AGS

A melatonina é tem ganhado destaque pela sua capacidade de modulação dos parâmetros carcinogênicos e por consequência atuação anti-neoplásica em diversas linhagens de tumores. Com o propósito avaliar a citotoxicidade das diferentes concentrações de melatonina, bem como definir as melhores concentrações e tempo de estímulo das células AGS foram executados os ensaios de viabilidade mitocondrial. Para o ensaio de viabilidade foi definido uma curva de concentração que abrangeu as concentrações de 0.625, 1.25, 2.5, 3.75 e 5mM sob os tempos de estímulo de 24, 48 e 72 horas. Foi observado que no tempo de 24 horas apenas as concentrações acima de 2.5mM foram capazes de reduzir a viabilidade das células AGS, enquanto para os tempos de 48 e 72 horas todas as concentrações promoveram redução da viabilidade celular, bem como houve uma intensificação da redução de viabilidade para as concentrações acima de 2.5mM.

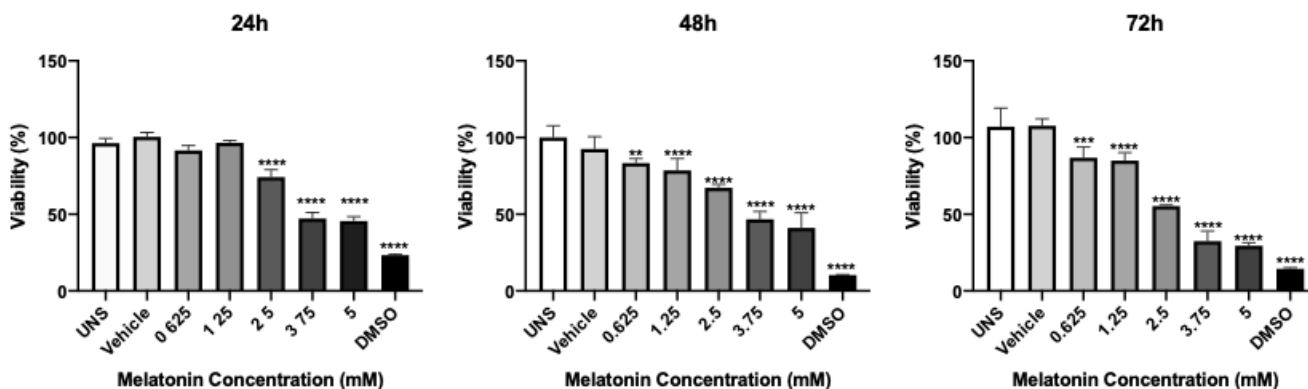


Figura 4. Melatonina reduz a viabilidade mitocondrial de células de câncer de gástrico AGS. As células foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 0,625mM, 1.25mM, 2.5mM, 3.75 mM e 5mM nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após os estímulos, as células foram expostas ao MTT e a citotoxicidade foi calculada a partir das médias dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % vivas. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=5), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos (***) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivamente) em comparação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.2 A melatonina reduziu a proliferação celular de células de câncer gástrico

Subsequente ao ensaio de viabilidade celular mitocondrial, foi analisado se a melatonina seria capaz de inibir a proliferação celular das células de câncer gástrico AGS. Para tal, foi utilizada a sonda fluorescente permeável a membrana CFSE. No citoplasma, o CFSE se liga a aminas biogênicas, emitindo fluorescência, de modo que a divisão celular promove também a divisão da fluorescência, sendo assim, a maior intensidade de fluorescência inversamente proporcional à proliferação. A partir desse ensaio, a curva de doses foi restringida em três concentrações que promoveram baixa, média e uma intensa modulação da viabilidade mitocondrial, sendo elas 0.625, 2.5 e 5mM respectivamente. Foi observado que para o tempo de 24 horas, todas as concentrações de melatonina reduziram a proliferação celular em comparação às células não estimuladas. As células estimuladas com a concentração de 2.5mM apresentaram diferenças significativas em comparação às células estimuladas com a concentração de 5mM. Em 24 horas de estímulo foi observado um aumento da proliferação das células estimuladas com a concentração de 5mM em comparação às células estimuladas com 2.5mM. Contudo, em 48 e 72 horas, observou-se um efeito antagônico, em que há uma

drástica redução da proliferação de células estimuladas com a concentração de 5mM em comparação às células estimuladas com 2.5mM.

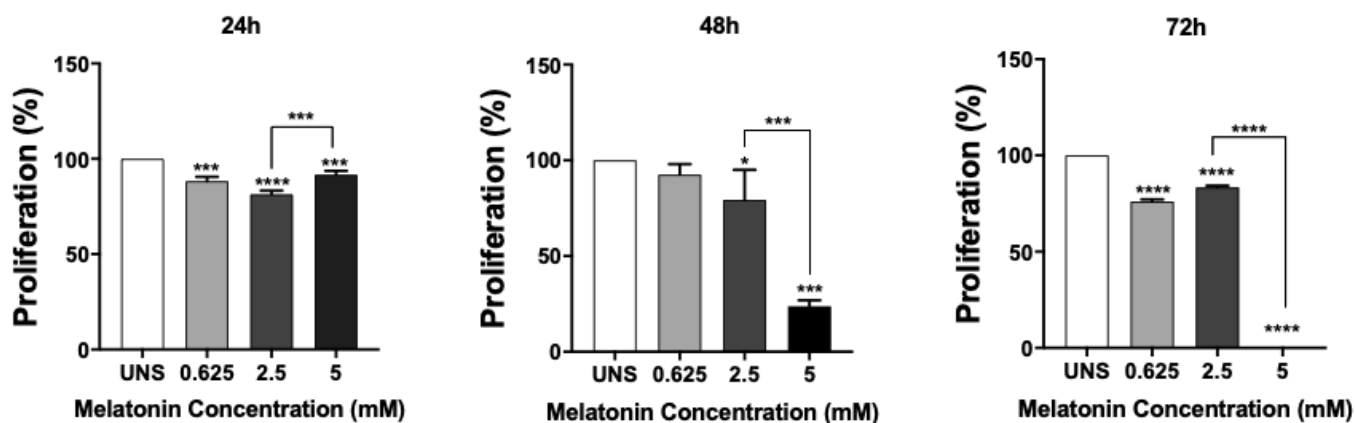


Figura 5. Melatonina reduz a capacidade proliferativa das células AGS. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 0.625, 2.5 e 5mM nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Antes dos estímulos, as células foram marcadas com CFSE (FL-1) e analisadas em citômetro FACS Verse. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (***) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas em as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.3 A melatonina aumentou o aprisionamento de células de câncer gástrico na fase G1

Após a análise de proliferação celular, objetivou-se a investigação de quais fases do ciclo celular poderiam estar sendo modulados pelas diferentes concentrações de melatonina. O ciclo celular foi analisado através da marcação com a intercalante de DNA iodeto de propídeo (PI). Foi observado que no tempo de 24 horas, a melatonina na concentração de 5mM foi capaz de modular o ciclo celular no tempo de 24 horas promovendo o aumento, em cerca de 20%, de células na fase G1 e reduzindo a porcentagem de células, em aproximadamente 17%, na fase S em comparação às células não estimuladas. Após 48 horas de estímulo, foi observado um aumento de 13% de células em fase G1 quando estimuladas na concentração de 2.5mM em paralelo a uma redução de 30% de células em fase G2/M em comparação às células não estimuladas. Seguindo a mesma tendência, foi observado que no tempo de 72 horas de estímulo, a melatonina na concentração de 2.5mM foi capaz de aumentar a porcentagem de células na fase G1, cerca de 14%, e reduzir a porcentagem de células na fase G2/M, em cerca de 20%, em

comparação às células não estimuladas. Não houveram células suficientes da condição estimuladas com a concentração de 5mM de melatonina para a caracterização das fases do ciclo celular para os tempos de 48 e 72 horas. A concentração de 0.625mM não foi capaz de promover nenhuma modulação das fases do ciclo celular em células AGS em nenhum dos tempos investigados em comparação às células não estimuladas.

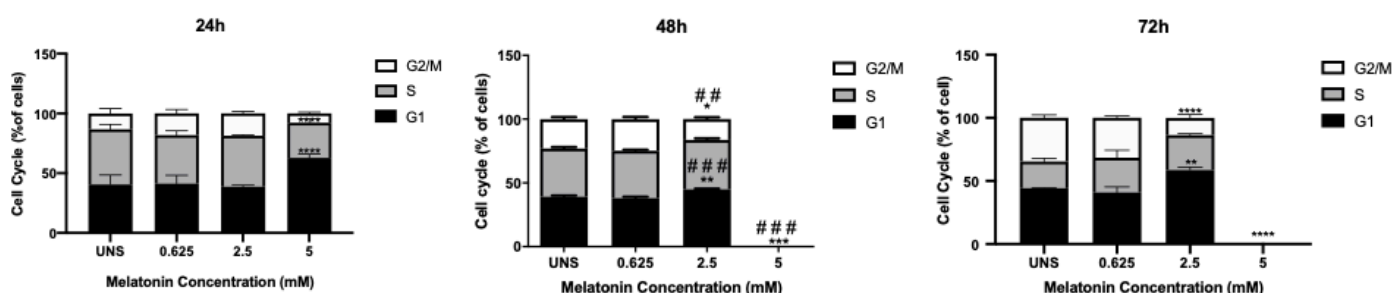


Figura 6. Melatonina aumentou o aprisionamento de células de câncer gástrico na fase G1. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 0.625mM, 2.5mM e 5mM por 24, 48 e 72 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL-2) e analisadas em citômetro FACS Verse. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=4), e um asterisco (*), dois asteriscos (**), e três asteriscos (***) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em comparação ao não estimulado (UNS). Enquanto um hashtag (#), dois hashtags (##) e três hashtags (###) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em comparação à concentração de 5mM. Ambas indicadas por One Way ANOVA e pós test de Tukey.

5.4 A concentração de 5mM de melatonina promoveu o aumento da fragmentação nuclear em 48 e 72h

Uma vez que houve a modulação do ciclo celular, houve o interesse em investigar se a melatonina poderia estar induzindo a fragmentação nuclear das células AGS. Para tal, foram considerados as células do experimento anterior que apresentaram uma quantidade de DNA inferior ao de células em intérfase.

Foi observado que em 24 horas não houve indução de fragmentação nuclear, de modo que todas as condições, incluindo as células não estimuladas, apresentavam cerca de 10% de células com núcleo fragmentado. No entanto, após 48 horas e 72 horas, é possível observar um significativo aumento da porcentagem de células com núcleo fragmentado de células estimuladas com a concentração de

5mM. Surpreendentemente, foi observada porcentagens estatísticas semelhantes na proporção de células em fragmentação quando estimuladas na concentração de 5mM em comparação às células não estimuladas e estimuladas na concentração de 2.5mM nos dois tempos analisado. De maneira geral, foi observado um aumento de 85% de células fragmentadas em comparação às células UNS e em cerca de 75% em comparação à concentração de 2.5mM em ambos os tempos de estímulo. Dados que corroboram com os eventos observados no ciclo celular.

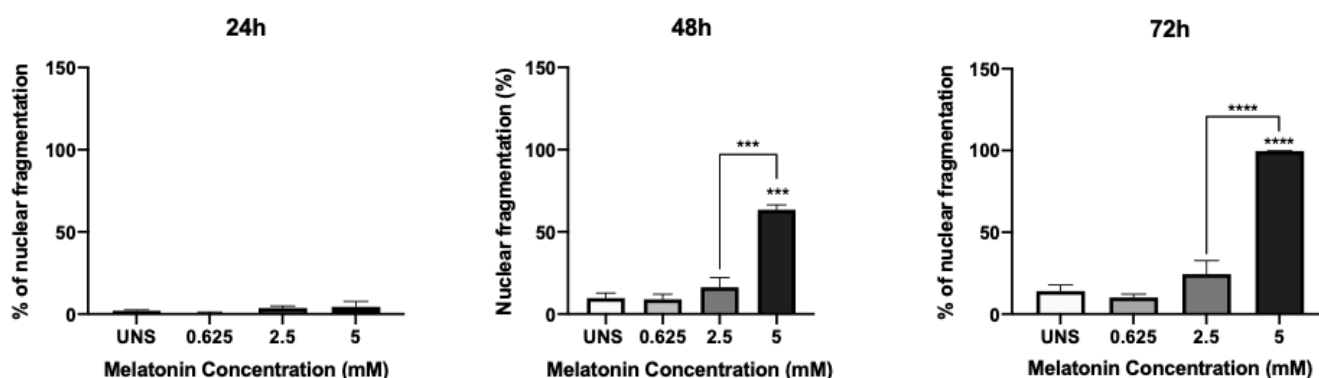


Figura 7. Melatonina promoveu aumento de fragmentação nuclear em células AGS. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 0.625mM, 2.5mM e 5mM por 24, 48 e 72 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL-2) e analisadas em citômetro FACS Verse. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas em as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.5 A melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dose e tempo dependente

De modo a investigar o perfil de ativação das células, foi analisado o papel da melatonina na biogênese de corpúsculos lipídicos em células de câncer gástrico AGS nos tempos de 24 e 48 horas de estímulo. Foi observado que as concentrações de 2.5 e 5mM foram capazes de reduzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em comparação às células não estimuladas nos tempos de 24 e 48 horas, indicando redução da ativação celular. A concentração de 0.625mM não foi capaz de promover modulações na biogênese de corpúsculos lipídicos nos tempos investigados em comparação às células não estimuladas. No entanto, apresentou diferença em comparação as concentrações de 2.5 e 5mM.

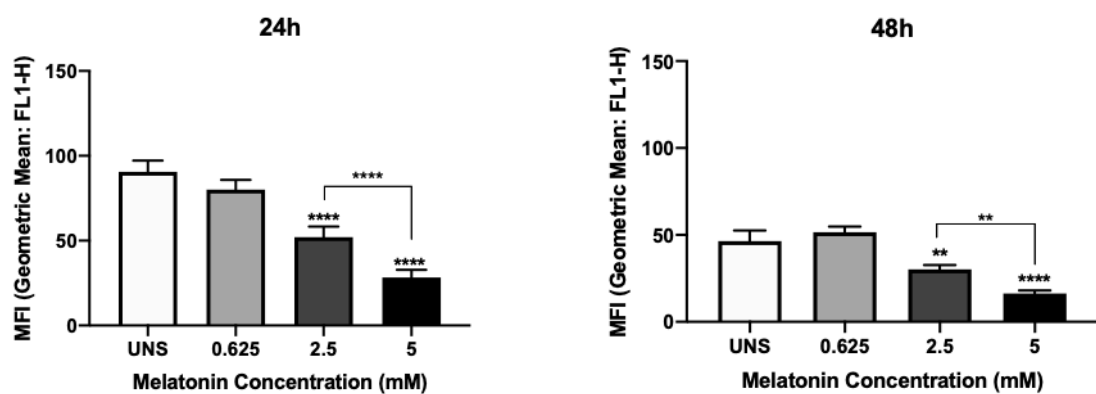


Figura 8. Melatonina reduziu a biogênese de corpúsculo lipídico de maneira dose e tempo dependente. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas por 24 e 48 horas com melatonina nas concentrações de 0.625mM, 2.5mM e 5mM. As células foram marcadas com a sonda lipofílica Bodipy (FL-1) e adquirida em citômetro FACS Verse. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=5), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas cm as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.6 A melatonina promoveu redução da produção de espécies reativas em tempos iniciais e o subsequente aumento após 24 horas de estímulo

Uma vez que a melatonina é amplamente reconhecida pelo seu papel antioxidante, consideramos de suma importância a avaliação da produção de espécies reativas sob o estímulo com a molécula. Observou-se que as células de câncer gástrico AGS estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5 mM apresentaram uma redução significativa de produção de espécies reativas em comparação às células não estimuladas e entre as concentrações de 2.5 e 5mM. Enquanto as células não estimuladas apresentaram uma média de fluorescência próximo a 20 unidades arbitrárias (u.a.), as células estimuladas com melatonina na concentração de 2.5mM apresentou média entorno de 10 u.a. De forma semelhante, as células estimuladas com 5 mM apresentaram média de fluorescência da produção de espécies reativas entorno de 7 a.u. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo e apresentou uma média de fluorescência no tempo 0 de aproximadamente 20 e de 30 a.u.

Decidimos então avaliar se o fenômeno se manteria em um tempo mais tardio de estímulo. Estimulamos as células por 24 horas e realizamos o mesmo ensaio de forma pontual. Observamos que houve um aumento significativo da produção de espécies reativas em comparação às células não estimuladas. Demonstrando que o efeito anti-

oxidante da melatonina ocorre em tempos iniciais, mas não se mantém por longos períodos de estímulos.

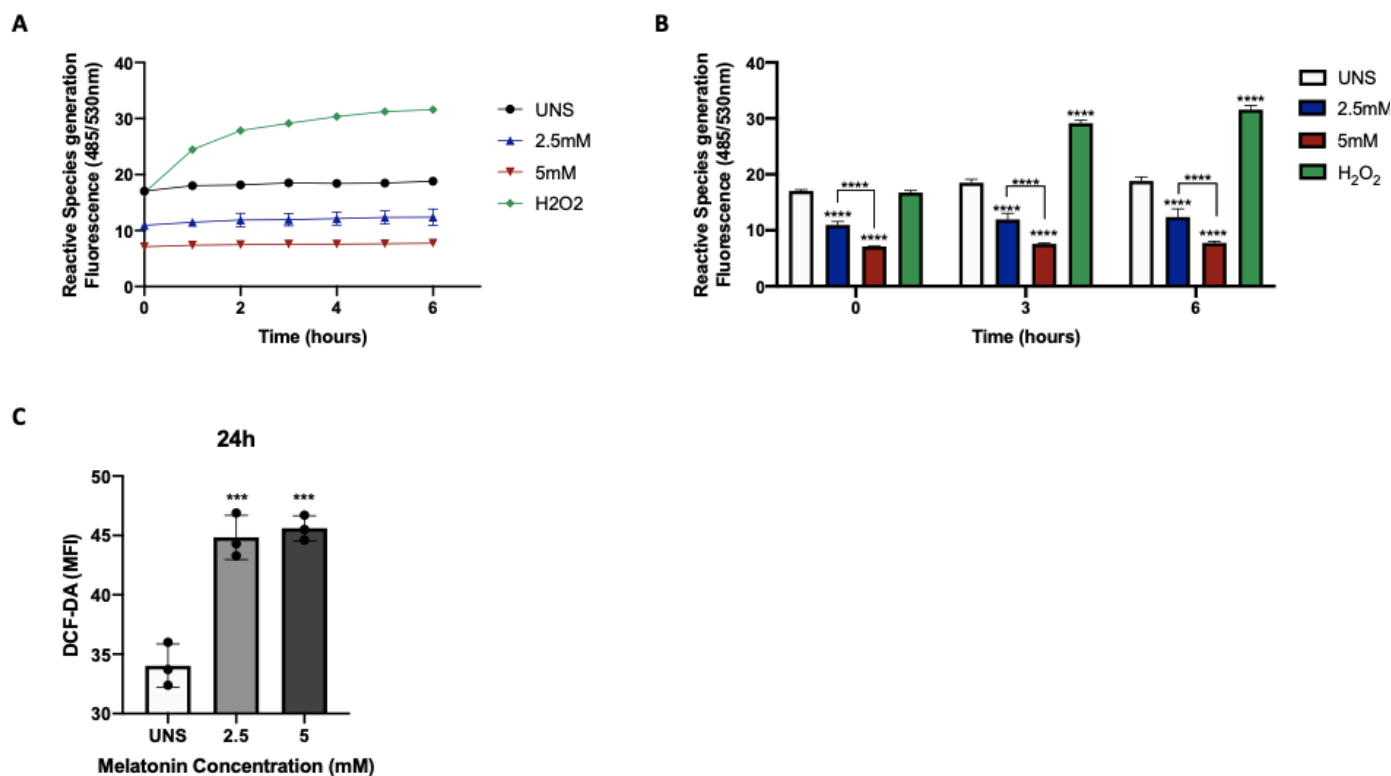


Figura 9. Melatonina promoveu redução, em tempos iniciais, e subsequente aumento da produção de espécies reativas nas células AGS. As células AGS foram plaqueadas, marcadas com a sonda DCF-DA e sequência estimuladas por 6 horas, cinética, ou 24 horas, leitura pontual, com melatonina nas concentrações de 2.5mM e 5mM. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo apenas na análise cinética. Curva cinética da produção de espécies reativas de oxigênio durante 6 horas de estímulo com melatonina(A), Representação estatística em gráfico de barras dos tempos de 0, 3 e 6 horas de estímulo (B), Produção de espécies reativas de oxigênio após 24 horas de estímulo (C). Os valores de fluorescência (RFU) da cinética foram obtidos por espectrofotometria e a leitura pontual por citometria de fluxo canal de fluorescência FL-1. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=5), e um asterisco (*) e dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas em as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.7 A melatonina reduziu os níveis de glutathiona total (tGSH) e reduzida (GSH) em células de câncer gástrico AGS

Em continuidade às avaliações do papel antioxidante da melatonina em células de câncer gástrico, vimos a necessidade de avaliar se poderia estar havendo modulação da glutathiona. A glutathiona é um tripeptídeo antioxidante constitutivo no organismo que pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A razão entre suas formas são utilizadas para avaliar estados redox. Para este experimento, as células AGS foram estimuladas com melatonina apenas na concentração de 2.5mM. Observamos que o estímulo de melatonina por 24 horas promoveu redução da glutathiona total (tGSH) e reduzidas (GSH) em comparação às células não estimuladas. Contudo, não foram observadas alterações nos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e da razão GSSG/tGSH não apresentaram diferenças significativas. Hipotetizamos que a GSSG possa ter sido exportada ao meio extracelular em um evento precoce, indicando a necessidade da realização do experimento em tempos iniciais de estímulo.

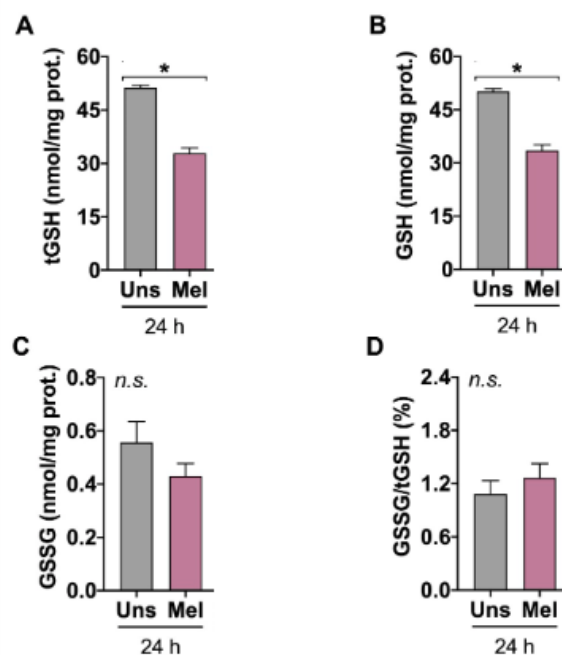


Figura 10. A melatonina reduziu os níveis de tGSH e GSH em células de câncer gástrico AGS. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 mM por 24 horas. Após os estímulos, as células foram lisadas e os valores de tGSH, GSH e GSSG determinados por espectrofotometria à 412nm e comparados a curva padrão. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por ANOVA e pós-teste de Tukey.

5.8 A Melatonina reduziu a respiração oxidativa das células de câncer gástrico

Considerando que a mitocôndria é apontada como o local de síntese celular de melatonina, sofrendo a ação mitócrina dessa molécula, além de também ser o principal sítio de produção de espécies reativas de oxigênio, nos questionamos se o funcionamento dessa organela células poderiam estar sendo afetadas pelo estímulo com melatonina. Para avaliar a função mitocondrial foi realizado um ensaio de respirometria através do consumo de oxigênio da organela.

A partir dos dados das curvas gerado pelo uso do inibidor da ATP sintase (oligomicina), de um agente desacoplador do gradiente de prótons (CCCP), e um inibidor do complexo III (antimicina A) foram extraídos os seguintes parâmetros: Respiração basal, capacidade respiratória máxima, respiração ligada a ATP e capacidade de reserva.

A respiração basal é obtida através dos valores de consumo sem a interferência de inibidores. Foi observado que o estímulo de 24 horas com melatonina nas concentrações

de 2.5 e 5mM reduziram em 30 e 75%, respectivamente, o consumo de oxigênio em comparação as células não estimuladas, bem como em 70% entre as concentrações. Adicionamos, então, o inibidor da ATP-sintase oligomicina para avaliar a respiração ligada a ATP (*ATP-linked respiration*). A respiração ligada a ATP de células estimuladas com melatonina também sofreu redução significativa. As células estimuladas com as concentrações de 2.5 e 5mM apresentaram redução de 54% e 87%, respectivamente, quando comparadas às células não estimuladas e de 72% quando comparamos as condições entre si. Em sequência, adicionamos o CCCP um agente desacoplador do gradiente de prótons para avaliar a capacidade respiratória máxima dessas células. Observamos uma redução de 28% e 83% da capacidade respiratória máxima dessas células estimuladas com melatonina na concentração de 2.5 e 5mM, respectivamente, em comparação as células não estimuladas, bem como foi observado uma redução de 75% da capacidade máxima entre as células estimuladas com a concentração de 5mM em comparação as estimuladas com 2.5mM. Por fim, analisamos a capacidade de reserva das células, o parâmetro é obtido através da subtração da respiração basal pela capacidade respiratória máxima. A capacidade de reserva das células estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM apresentaram redução de 29% e 90% em comparação as células não estimuladas e de cerca de 85% entre as condições. O conjunto de dados indica disfunção mitocondrial mediada pelo estímulo com melatonina.

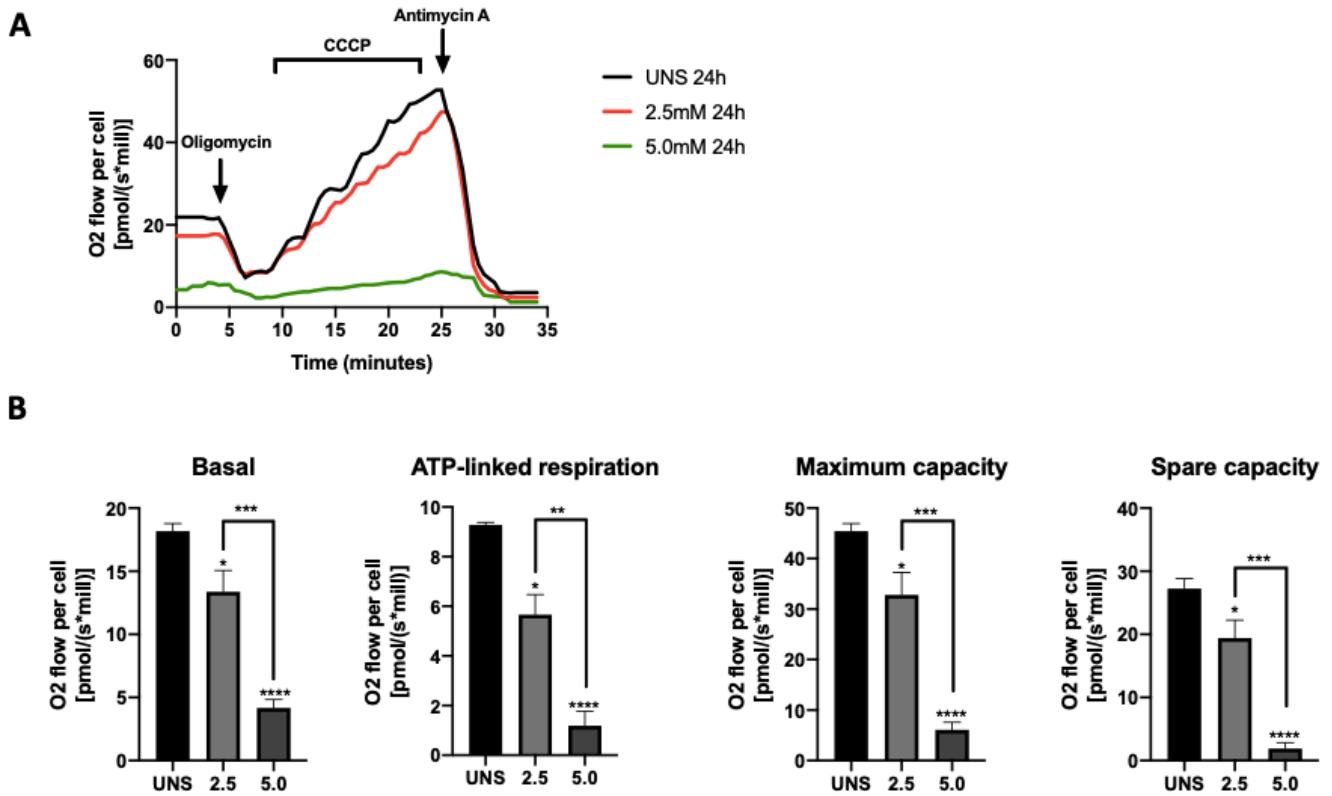


Figura 11. Melatonina reduz a respiração oxidativa em células AGS. As células AGS foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM. Após 24h, a taxa de consumo de oxigênio (OCR) (A), a respiração basal, capacidade máxima respiratória, consumo de oxigênio associado à síntese de ATP (ATP linked) e a capacidade de reserva (B) foram analisados por respirometria de alta resolução, sob a ação dos inibidores Oligomycin (1.25μM), CCCP (100nM) e antimicina-A (2.5μM). Cada barra representa a média do percentual ± DP (n=5), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos (***) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas em as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.9 A melatonina modulou a dinâmica mitocondrial de células de câncer gástrico AGS

A fim de investigar se a redução da capacidade respiratória das células de câncer gástrico estimuladas com melatonina poderia estar relacionada a alterações da morfologia mitocondrial foi realizada a microscopia confocal da célula. As mitocôndrias foram marcadas com a sonda fluorescente Mitotracker red, enquanto o núcleo foi marcado com a sonda fluorescente DAPI. Foi observada um encurtamento e diminuição da distribuição e conexão de mitocôndrias em células estimuladas com melatonina na concentração de

2.5 e 5mM em comparação às células não estimuladas que apresentam um fenótipo mais alongado, distribuído ao longo do citoplasma celular e interconectado. Mais do que isso, observamos um maior acúmulo de mitocôndrias de células estimuladas na região perinuclear, demonstrando que a melatonina exerce papel modulatório na dinâmica mitocondrial.

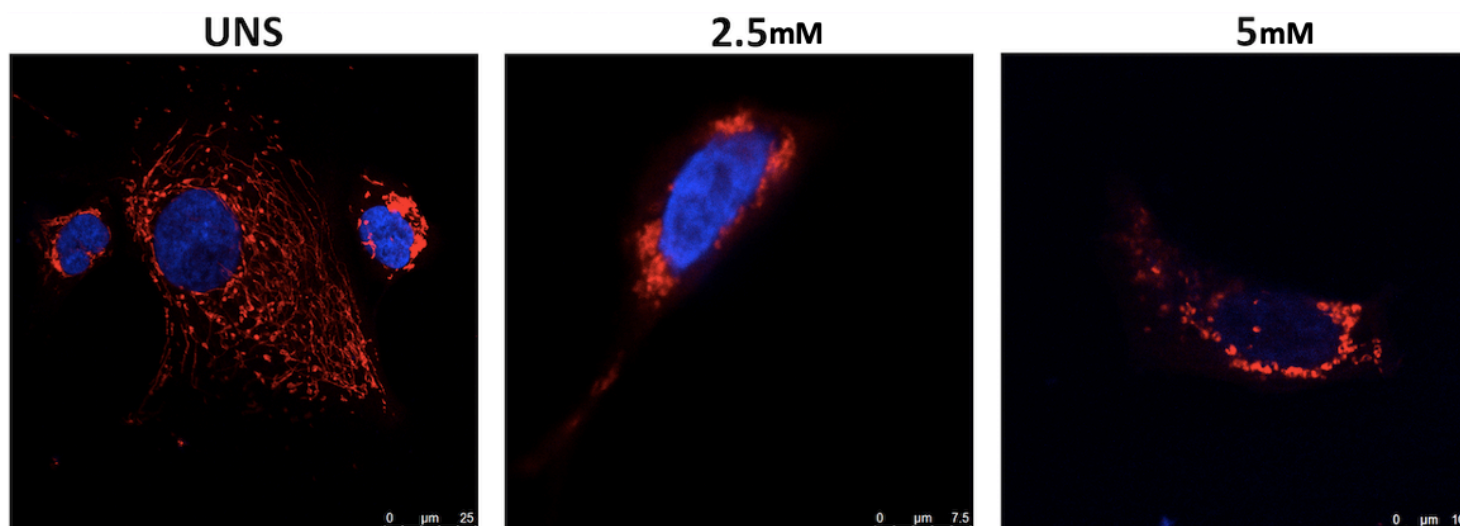


Figura 12. Melatonina modulou a dinâmica mitocondrial de células de câncer gástrico AGS. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5mM e 5mM por 48 horas. Em seguida, as células foram marcadas com a sonda mitotracker para marcação mitocondrial e DAPI para marcação do núcleo. As imagens foram obtidas por microscopia confocal.

5.10 As concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina modularam de forma diferencial o perfil inflamatório de células de câncer gástrico

Considerando o papel anti-inflamatório da melatonina, questionamos se esse papel poderia ser observado células de câncer gástrico AGS. Foi observado que a melatonina na concentração de 2.5 mM foi capaz de aumentar a produção das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α após 24 horas de estímulo em comparação às células não estimuladas e estimuladas com a concentração de 5mM. Entretanto, as células estimuladas com a concentração de 5mM promoveu uma redução significativa da produção das citocinas inflamatórias, bem como de VEGF em comparação às células não

estímuladas e em comparação estimuladas com a concentração de 2.5mM. O estímulo com melatonina não promoveu alteração da produção de IL-6.

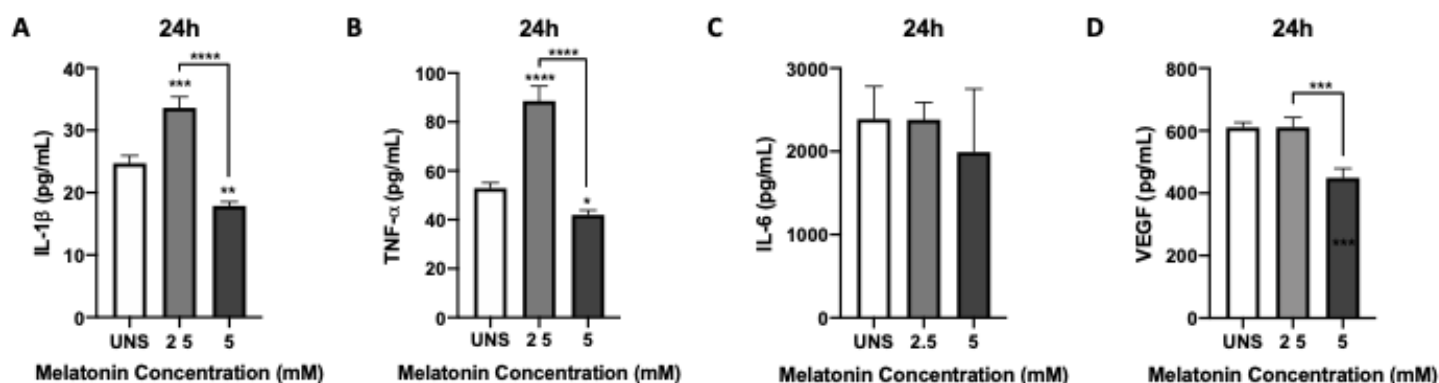


Figura 13. As concentrações de melatonina modulam de forma diferencial o perfil inflamatório de células AGS após 24 horas de estímulo. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5 mM por 24 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e VEGF (D) foram dosadas por ELISA. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por ANOVA e pós-teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas com as concentrações de 2.5 e 5 mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

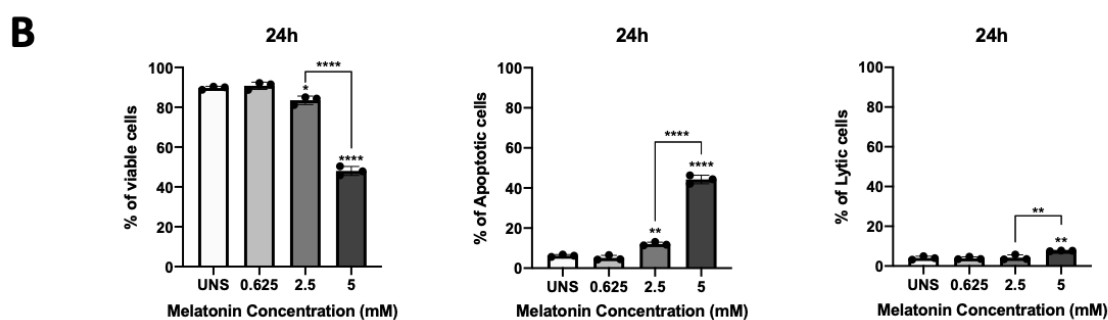
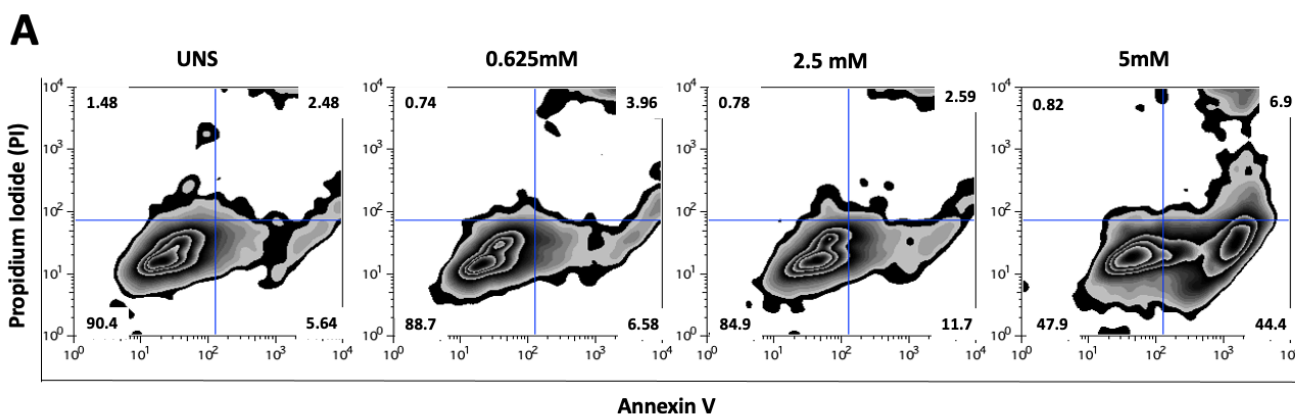
5.11 A melatonina promoveu o aumento de morte das células de câncer gástrico AGS de maneira dose dependente

Tendo em vista o conjunto de dados observados anteriormente, questionamos se a melatonina poderia estar induzindo aumento de morte celular, bem como questionamos qual seria o perfil de morte predominante induzido por esta molécula. Para tal, foi executado o ensaio de caracterização do perfil de morte Anexina-V (AV) e Iodeto de propídio (PI).

A figura 13 A apresenta os dados representativos acerca do fenômeno observado em células de câncer gástrico AGS. Após 24 horas de estímulo, foi possível observar um aumento progressivo, de forma dose dependente, das populações de células positivas para Anexina V (FL-1), indicando um perfil de morte majoritariamente apoptótico. Uma vez que células não estimuladas apresentam uma porcentagem de cerca de 5.64% de mortes

positivas para Anexina, enquanto as concentrações de 0.625mM, 2.5mM e 5mM apresentam de 6.58%, 11.7% e 44.4%, respectivamente. De forma, que a concentração de 5 mM demonstrou exercer alta citotoxicidade, uma vez que houve a redução de cerca de 90% de células viáveis, quando não estimuladas, para uma porcentagem inferior a 50%. Conforme resultado previamente sugerido pelo ensaio de MTT.

Em paralelo, observou-se um singular aumento na proporção de células positivas para a sonda Iodeto de propídeo (FL-3) e dupla marcação (FL-1/FL-3) que indicam morte por perda de integridade de membrana entre as concentrações de 2.5 e 5mM. Enquanto o somatório das células em morte por perda de integridade de membrana acumulava cerca de 3.96% para a condição não estimulada, as células estimuladas com as concentrações de 0.625, 2.5 e 5mM acumulavam cerca de 4.7%, 3.35% e 7.73%. Em termos estatísticos, apenas a concentração 2.5mM apresentou diferença significativa, indicando uma possível redução desse perfil de morte em comparação a concentração de 5mM.



5.12 A melatonina reduziu a liberação da enzima lactato desidrogenase pelas células de câncer gástrico AGS

O papel pró-apoptótico da melatonina, e seus mecanismos, é fenômeno amplamente descrito na literatura. Com isso, constatamos a relevância de analisar a modulação da morte lítica nesse contexto. Um dos principais marcadores da morte piroptótica é a liberação da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular. Tendo isso em vista, coletamos o sobrenadante das células estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM pelos tempos de 3, 12, 24, 48 e 72 horas. Os sobrenadantes coletados foram submetidos ao ensaio colorimétrico de liberação de LDH e lidos pontualmente por espectrofotometria. Foi observado que houve redução na liberação de LDH nos tempos de 3, 48 e 72 horas de ambas as concentrações em comparação às células

Figura 14. Melatonina induz aumento de morte de forma dose dependente em células AGS. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 0.625mM, 2,5mM e 5 mM por 24 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Anexina-V fluorescente (FL-1) e Iodeto de propídeo (FL-3) e analisadas em citômetro FACS Calibur. Figura representativa em zebra plot dos perfis de morte induzido em células AGS pela melatonina (A) Representação estatística em gráfico de barras (B). Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas cm as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

não estimuladas. Nos tempos de 3 e 48 horas a redução da liberação de LDH foi significativa entre as concentrações. Em 24 horas, apenas a concentração de 5mM foi capaz de reduzir a liberação de LDH em comparação às células não estimuladas.

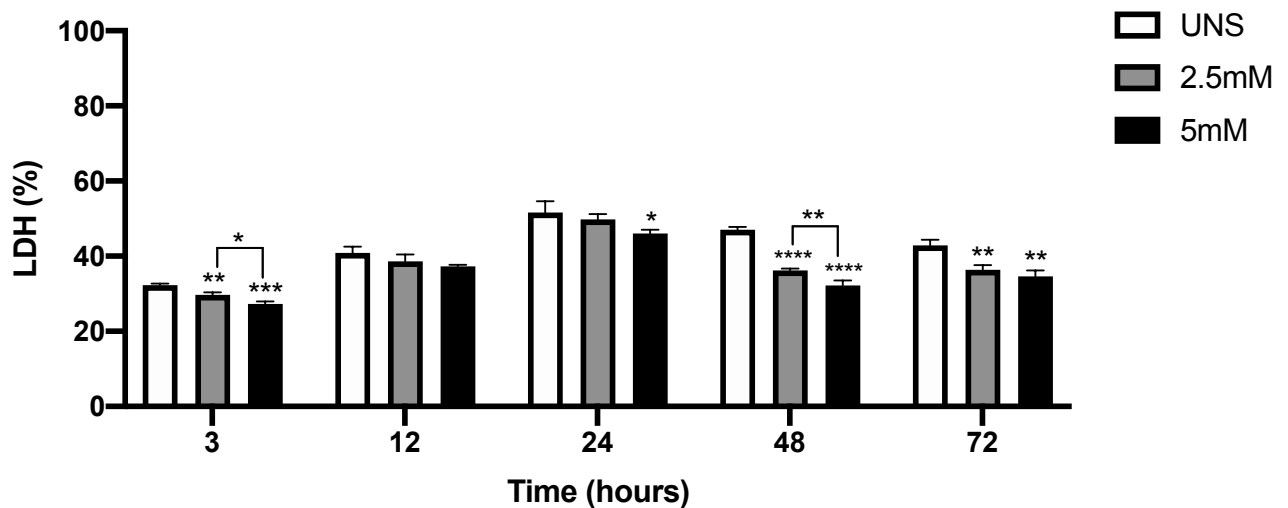


Figura 15. Melatonina promoveu redução da liberação de LDH. As células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5mM e 5 mM por 3,12, 24, 48 e 72 horas. Após os estímulos, os sobrenadantes das células foram coletados e expostos ao substrate mixture e em seguida lidos pontualmente por espectrofotometria. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas em as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.13 A melatonina reduziu a expressão de pró-caspase 1 após 24 horas de estímulo

Com o indicativo de possível modulação de morte lítica, decidimos avaliar se a melatonina seria capaz de modular a expressão de proteínas efetoras da piroptose. Foi analisado a expressão proteica da enzima característica da via canônica da piroptose em sua forma inativa, pró-caspase 1. Observamos que o estímulo das células de câncer gástrico com a concentração de 5mM de melatonina por 3 horas, aumentou significativamente a expressão da enzima pro-caspase 1. Enquanto, após 24 horas de estímulo foi observado uma expressiva redução da expressão da enzima de células estimuladas com as concentrações de 2.5 e 5 mM de melatonina.

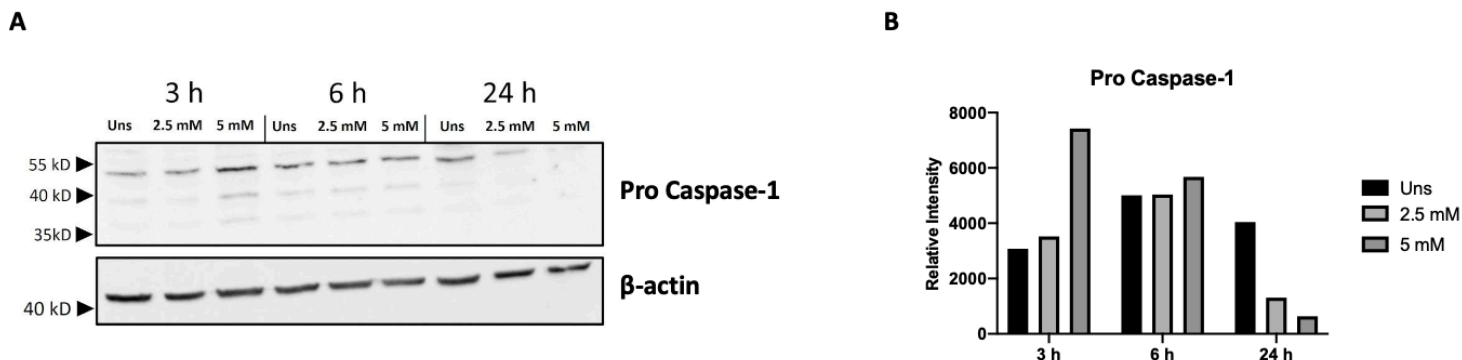


Figura 16. A melatonina reduziu a expressão de pró-caspase 1 após 24 horas de estímulo em células de câncer gástrico AGS. Células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina na concentração de 2.5 e 5 mM por 3, 6 e 24 horas. Após os estímulos, as células foram lisadas com tampão Triton, as proteínas foram quantificadas, separadas em gel de poliácridamida, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e marcadas com anticorpos correspondentes.

5.14 A concentração de 5mM de melatonina alterou a expressão de Gasdermina D em 24 horas

No mesmo sentido, decidimos avaliar a expressão da GSDMD. Proteína que, quando clivada, é responsável pela formação de poros de membrana, fenômeno característico da piroptose. Foi observado que o estímulo de células com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM por 3 e 6 horas demonstraram promover um leve aumento da expressão de GSDMD em comparação às células não estimuladas. Toda via, os estímulos com as mesmas concentrações por 24 horas promoveram um efeito antagônico, reduzindo a expressão da proteína, principalmente em células estimuladas na concentração de 5mM.

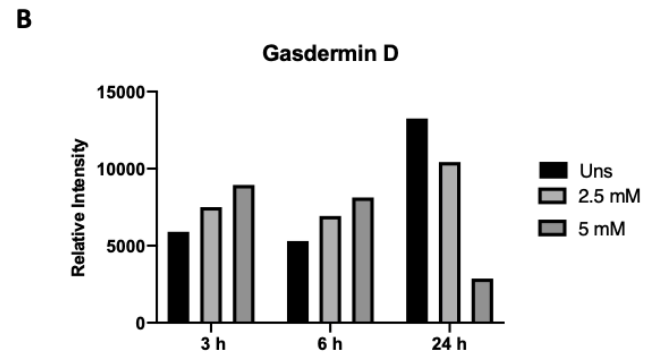
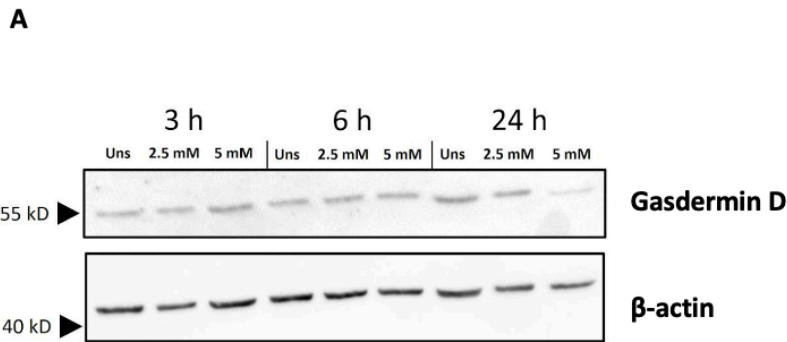


Figura 17. O estímulo de melatonina por 24 horas promoveu redução da expressão de Gasdermina D em células de câncer de gástrico AGS. Células AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina na concentração de 2.5 e 5 mM por 3, 6 e 24 horas. Após os estímulos, as células foram lisadas com tampão Triton, as proteínas foram quantificadas, separadas em gel de poliacrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e marcadas com anticorpos correspondentes.

5.15 A melatonina promoveu a redução da formação de poros na membrana plasmática

Com o intuito de avaliar como a melatonina poderia modular mortes líticas, avaliamos se a melatonina poderia atuar sobre a formação de poros na membrana plasmática. Para tal, utilizamos o ensaio de captação de PI por espectrofotometria para avaliar a formação de poros membranares. Observamos que as células estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5 mM apresentaram uma redução dose dependente, de cerca de 13 e 25% respectivamente, da captação de PI em comparação às células não estimuladas e cerca de 12% das concentrações entre si.

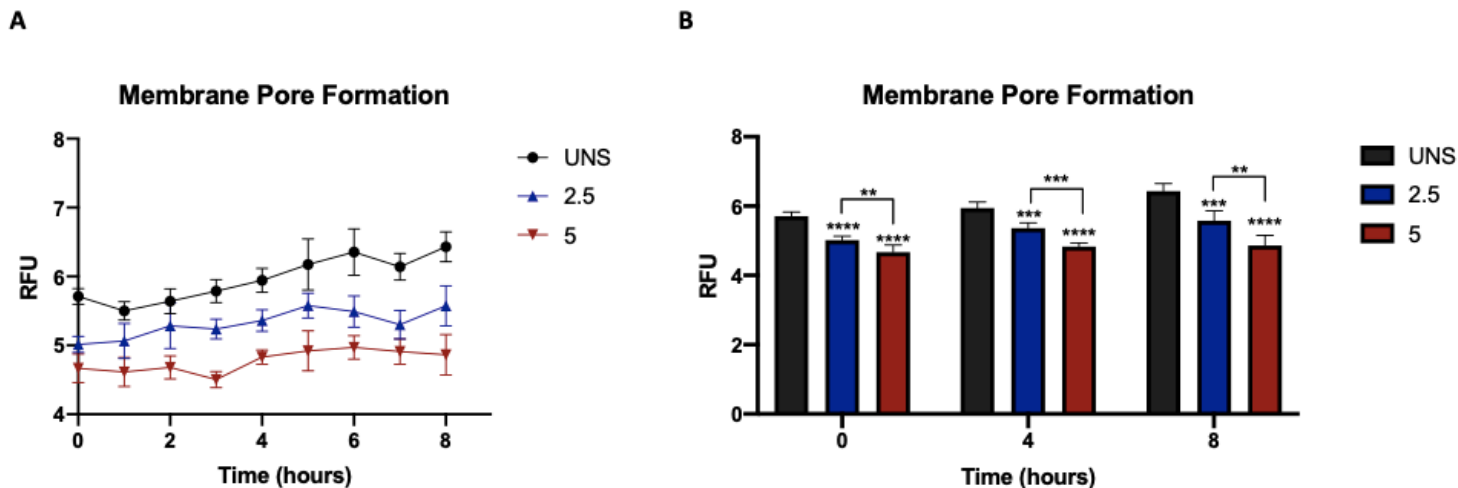


Figura 18. Melatonina previne a formação de poros na membrana plasmática de células de câncer gástrico AGS. Células de câncer gástrico AGS foram plaqueadas e estimuladas com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM por 8 horas e expostas a iodeto de propídeo. Curva cinética da formação de poros membranas de células não estimuladas (UNS) e estimuladas nas concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina (A), Representação estatística em gráfico de barras (B). Os valores de fluorescência (RFU) foram adquiridos em espectrofotômetro nos comprimentos de excitação 538 nm e de emissão 617 nm. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=5), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey. Os asteriscos acima do desvio padrão indicam comparação com a condição UNS, enquanto as comparações entre condições estimuladas em as concentrações de 2.5 e 5mM de melatonina são representadas pelos asteriscos acima das linhas conectoras acima das condições.

5.16 O pós tratamento com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM foram capazes de prevenir a formação de poros membrana plasmática induzido por LPS e ATP

Por fim, nos questionamos se a melatonina exerceria o mesmo efeito em um cenário de indução de poros na membrana plasmática dessas células. Com isso, vimos a necessidade de adaptar protocolos de indução de piroptose para células de câncer gástrico AGS. Para tal, fizemos o uso de LPS e ATP para indução de piroptose mediado por inflamassoma NLRP3 (Qing-Bing Zha et al. (2016)). Por tanto, um dos parâmetros utilizados foi a formação de poros na membrana que pode ser observado através do ensaio de captação de PI por espectrofotometria. As células AGS foram estimuladas por 24 horas com LPS e 45 minutos com ATP e em seguidas marcadas com a sonda impermeável PI. A leitura da fluorescência foi medida de forma cinética ao longo de 8 horas após o estímulo com ATP. Foi observado que as células estimuladas apresentaram aumento progressivo da captação de PI chegando a cerca de 30% nos tempos de 4 e 8 horas. Demonstrando o sucesso do protocolo.

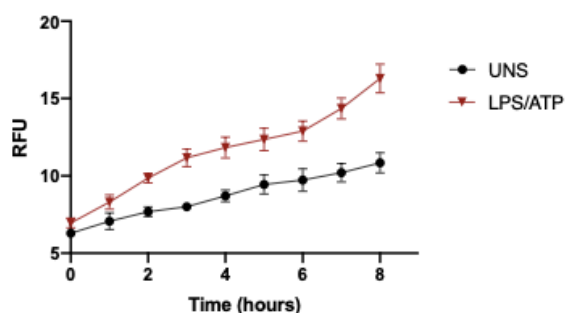
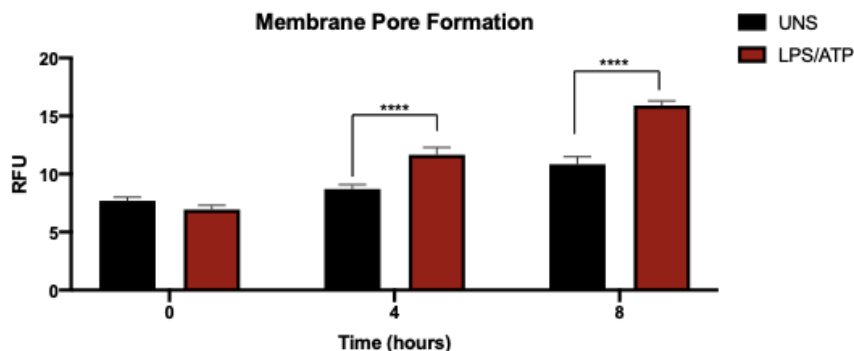
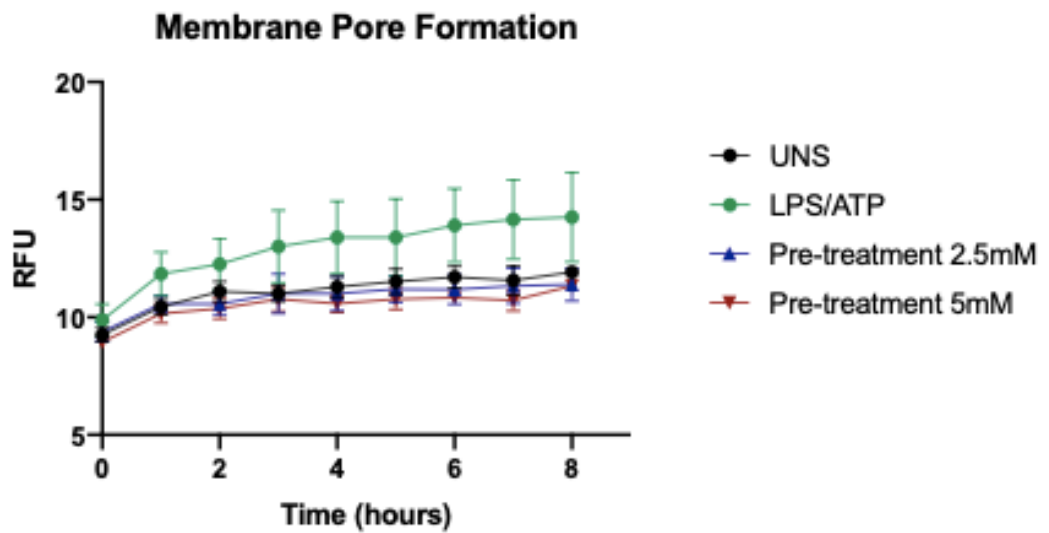
A**B**

Figura 19. LPS e ATP induz formação de poros na membrana plasmática de células de câncer gástrico AGS. Células de câncer gástrico AGS foram plaqueadas e estimuladas ou não com LPS nas concentrações de 10 μ M por 24 horas e ATP 5mM por 45 minutos e expostas a iodeto de propídeo. Curva cinética da formação de poros membranar em células não estimuladas (UNS) e estimuladas com LPS/ATP (A), Representação estatística em gráfico de barras (B). Os valores de fluorescência (RFU) foram adquiridos em espectrofotômetro nos comprimentos de excitação 538 nm e de emissão 617 nm. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=5), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente) indicado por One-Way ANOVA e pós teste de Tukey.

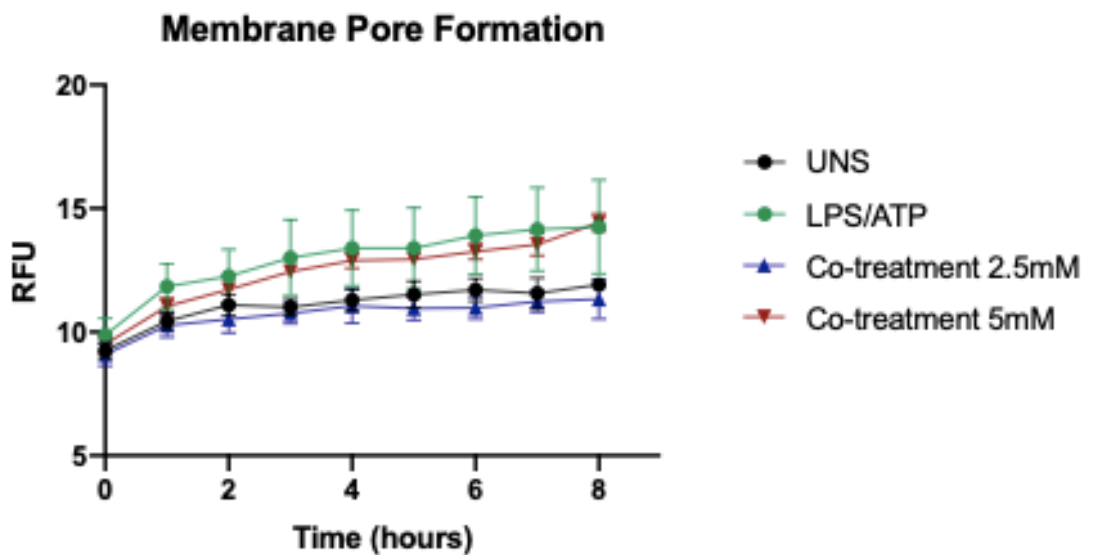
Após a indução da formação de poros, passamos ao segundo objetivo desse experimento que foi avaliar se a melatonina poderia estar inibindo a formação de poros induzida pelo LPS e ATP. A partir da mesma análise realizada anteriormente, três novas condições foram inseridas: pré-tratamento, co-tratamento e pós tratamento com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM. Foi observado que o pré-tratamento de 1 hora com melatonina foi capaz de manter a integridade de membrana em um perfil equivalente às células não estimuladas com LPS e ATP. Contudo, o co-tratamento com as concentrações de 2.5 e 5 mM apresentaram efeitos antagônicos. Enquanto o co-tratamento com a concentração de 2.5mM demonstrou ter um efeito protetivo contra a formação de poros mantendo um perfil equivalente às células não estimuladas, a concentração de 5mM promoveu aumento da formação de poros de forma equivalente as

células estimuladas com LPS e ATP. Surpreendentemente, o pós-tratamento com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM foram capazes de reduzir a formação de poros na membrana em comparação às células não estimuladas e às células estimuladas com LPS e ATP.

C



D



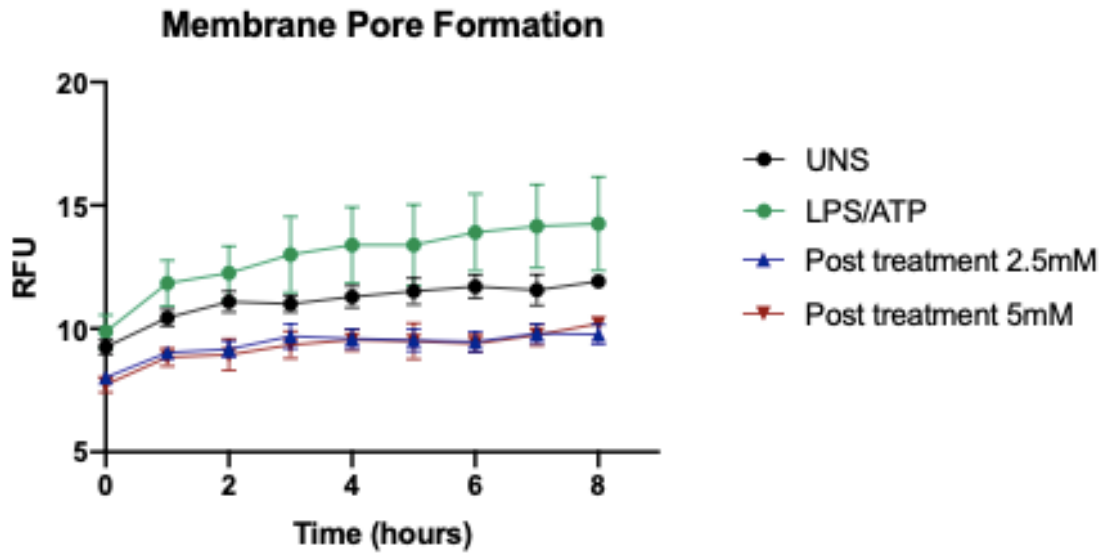
E

Figura 20. O pós-tratamento com melatonina de células estimuladas com LPS/ATP reduz formação de poros na membrana plasmática de células AGS. Células de câncer gástrico AGS foram plaqueadas e estimuladas com LPS nas concentrações de 10 μ M por 24 horas e ATP 5mM por 45 minutos na condição LPS/ATP ou não foram estimuladas (UNS). Os tratamentos com melatonina nas concentrações de 2.5 e 5mM ocorreram por 1 hora antes do estímulo com LPS/ATP na condição pré-tratada (A), simultaneamente ao LPS/ATP na condição co-tratamento (B) ou após estímulo LPS/ATP na condição pós tratamento (C). Todas as condições foram expostas ao PI. Os valores de fluorescência (RFU) foram adquiridos em espectrofotômetro nos comprimentos de excitação 538 nm e de emissão 617 nm.

6. Discussão

Devido à abrangência de atuações da melatonina no organismo, não surpreendentemente, essa indolamina passou a ser investigada como agente terapêutico em um amplo espectro de patologias. Atualmente a terapia com melatonina possui eficácia clínica comprovada para os tratamentos de distúrbios do sono e correção do sono em idosos e como coadjuvante terapêutico em doenças neurológicas e neurodegenerativas como doenças do espectro autista, síndrome de déficit de atenção e hiperatividade, Smith- Magenis entre outros. Em fase de experimentação clínica encontram-se patologias como distúrbios depressivos, coadjuvante no tratamento de lesões pós-isquêmicas, doenças metabólicas e antineoplásico (E.J. Sanchez-Barcelo et al. (2010); Ana Claudia et al. (2020)).

No contexto tumoral, a melatonina tem ganhado grande destaque uma vez que apresenta propriedades oncostáticas e indutoras de morte apoptótica especificamente em células transformadas. Ao passo que para células não transformadas, esta molécula exerce funções protetoras e anti-apoptóticas (Mariano Bizzarri et al. (2013)). Em um estudo pioneiro, foi observado que em um grupo de animais que receberam substância carcinogênica associado ao tratamento com melatonina, por 90 dias, não apresentaram desenvolvimento tumoral, enquanto no grupo controle, que recebeu a substância e veículo, 50% dos animais desenvolveram o tumor (Lawrence Tamarkin, et al. (1981)). No início dos anos 90, outro estudo demonstrou que a melatonina foi capaz de aumentar a sensibilidade de células de câncer de mama à quimioterápicos *in vitro* (S T Wilson 1 et al. (1992)). Resultados que despertaram ainda mais interesse da investigação do seu potencial anti-tumoral e caracterização dos mecanismos associados.

Especificamente em estudos pré-clínicos *in vitro*, foi demonstrado que a ação anti-tumoral da melatonina, caracterizada pela capacidade de indução da morte dessas células, é precedida pela sua capacidade oncostática. A modulação do ciclo celular em favor do maior aprisionamento de células tumorais na fase G0/G1 é um evento frequentemente observado nas mais diversas linhagens como células de hepatocarcinoma, câncer cervical, câncer de próstata, entre outros (Javier Martín-Renedo et al. (2008); Tarun Minocha et al. (2022); Altannavch Nyamsambuu et al. (2022)). Dentro do presente trabalho, foi possível constatar que de forma similar a melatonina

também promoveu redução da viabilidade celular, bem como aumento da proporção de células em fase G1. Como consequência direta foi promovida uma redução da proliferação celular.

Os mecanismos associados a modulação do ciclo celular em células tumorais ainda não são bem elucidados. No entanto, alguns estudos demonstraram haver uma correlação entre o aumento da expressão dos receptores MT1 e a inativação do fator de transcrição NF-kB com um maior aprisionamento de células na fase G0/G1 (A González et al. (2007); Sara Carbajo-Pescador et al. (2011); Stephen Y. W. Shiu et al. (2013)). Ademais, outras evidências têm surgido, na qual é demonstrado que a atuação da melatonina se estende a modulação dos componentes de regulação do ciclo celular. A regulação do ciclo celular é um processo finamente coordenado pelas ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDK) e inibidores de ciclinas. Sabe-se que a desregulação ou disfuncionalidade dos componentes de regulação do ciclo celular é um dos mais característicos requisitos da carcinogênese. Nesse sentido, diversos estudos tem demonstrado que a melatonina pode estar atuando através da *downregulation* de ciclinas, *upregulation* de inibidores de CDKs e supressão das CDKs em células tumorais (Lifeng Liu et al. (2011); Ching-Ju Shen et al. (2016); Jun Song et al. (2018)). A fim de caracterizar por quais mecanismos a melatonina desencadeia a modulação do ciclo celular intentamos utilizar inibidores dos receptores MT1 e MT2, luzindole, bem como analisar a expressão de proteínas do ciclo celular.

Outro parâmetro fortemente presente na carcinogênese é a desregulação da produção de ROS, uma vez que danos oxidativos promovem efeitos nocivos à sobrevivência celular como dano ao material genético e instabilidade genômica. A instabilidade genômica, por sua vez, está associada a um aumento da probabilidade de ativação e acúmulo de oncogenes. Em um cenário cujo já haja o estabelecimento tumoral, as ROS estão associadas a modulação do microambiente tumoral. Atuando na resposta imune, modulando células estromais, bem como a angiogênese que provém suporte nutricional, metabólico além de viabilizar a migração de células cancerosas para outros tecidos (Eric C. Cheung, Karen H. Vousden (2022)). Tendo em vista o papel primordial antioxidante da melatonina em células não transformadas consideramos de suma importância avaliar se essa molécula exercerá a mesma função em células tumorais.

Surpreendentemente, a melatonina demonstra estar atrelada a uma maior produção de ROS em células cancerosas (Kian Chung Chok et al. (2021); Xiangyun Chen et al.

(2021)). Em muito tem se atribuído esse fenômeno a capacidade da melatonina de promover um *shift* metabólico nessas células mais fosforilativo nessas células. Há cerca de um século, Otto Warburg postulava um novo mecanismo metabólico adaptativo adotado por células cancerosas: a glicólise aeróbica, também conhecida como efeito warburg. Dogmatizou-se, então, que o efeito warburg seria perfil metabólico majoritariamente observado em células tumorais. Como já mencionado, em células extra-pineais a melatonina é produzida na mitocôndria, principal sítio de produção de ROS. Contudo, hipostetiza-se que a síntese dessa indolamina seja inibida em células tumorais (Russel J. Reiter et al. (2020)). Diversos estudos tem demonstrado que o estímulo, em experimentos in vitro, ou suplementação, em experimentos in vivos, com melatonina é capaz de promover a um aumento da respiração fosforilativa em células tumorais. O alto metabolismo tumoral associado a um perfil mais fosforilativo estaria atrelada a uma maior produção de ROS. Em células tumorais, a fosforilação oxidativa era descrita como um metabolismo menos eficiente para a manutenção de suas altas demandas, além do favorecimento da re-sensibilização de células quimiorresistente e maior indução de apoptose (Ana M. Sanchez-Sanchez et al. (2015); Xiangyun Chen et al. (2021)). No entanto, atualmente sabe-se que células tumorais possuem plasticidade metabólica podendo assumir ambos os metabolismos glicolíticos ou fosforilativo, ou até mesmo um metabolismo híbrido, para a manutenção da tumorigênese e metástase (Dongya Jia et al. (2018)).

Em nossos estudos, o estímulo de células de câncer gástrico apresentou redução da produção de espécies reativas nas primeiras 6 horas de estímulo. Entretanto, após 24 horas de estímulo com melatonina houve um aumento significativo da produção de espécies reativas. Nesse contexto, avaliamos se a respiração oxidativa poderia também estar sendo modulada pela melatonina. Contrariamente ao descrito para outras células tumorais, a melatonina promoveu redução da respiração oxidativa em células de câncer gástrico. Especulamos, então, se essa redução poderia estar associada a um possível efeito danoso da melatonina em mitocôndrias de células de câncer gástrico. Podemos então confirmar que a abundância, distribuição, morfologia e comunicação mitocondrial dessas células apresentaram clara distinção em comparação às células não estimuladas.

A mitocôndria é uma organela altamente dinâmica que possui a capacidade de se remodelar em processos de fusão (alongamento) e fissão (fragmentação). Esse fenômeno

é denominado dinâmica mitocondrial que visa o controle de qualidade mitocondrial, além da modulação do ciclo celular, apoptose, homeostase de cálcio entre outro (Lisa Tilokani et al. (2018)). A fusão é o resultado da união de 2 ou mais mitocôndrias que promove uma maior interconexão dessa organela. O processo é mediado pelas GTPases mitocondriais de membrana externa Mitofusina (MFN) 1 e 2 e da GTPase mitocondrial de membrana interna: *Optic Atrophy 1* (OPA1). A fusão está associada ao aumento da fosforilação oxidativa, e por consequência aumento da produção de ATP, diminuição da mitofagia, bem como difusão do conteúdo das matrizes mitocondriais. A difusão promove a atenuação do impacto de mutações no DNA mitocondrial e proteínas oxidadas que podem incidir na funcionalidade da organela (Stephen L. Archer (2013); Lisa Tilokani et al., 2018) (Lisa Tilokani et al. (2018)). Recentes estudos têm correlacionado o aumento de ATP a um aumento proporcional da capacidade metastática e resistência multi-drogas em cânceres de mama (Marco Fiorillo et al. (2021)).

Por outro lado, a fissão mitocondrial é caracterizada pela fragmentação da organela em porções menores. O processo é mediado pela proteína 1 relacionada a dinamina (DRP1) associadas a proteína homóloga da Fissão 1 (FIS1) e o fator de fissão mitocondrial (MFF) que romper as membranas mitocondriais por meio da hidrólise do GTP (Lisa Tilokani et al. (2018)). A fissão está atrelada a um aumento do perfil glicolítico, maior transporte e distribuição, aceleração da fissão mitótica e maior geração de espécies reativas de oxigênio, sendo este fenótipo o mais comumente observado em células tumorais (Jalees Rehman et al. (2012); Qi Xie et al. (2015); Peng Zou et al. (2016)).

As células de câncer gástrico AGS apresentaram maior alongamento, interconexão mitocondrial e distribuição citoplasmática da organela característica de um fenótipo denominado hiperfusão (Hanne Hoitzing et al. (2015)). No entanto, o estímulo com melatonina promoveu o encurtamento da mitocôndria, redução da abundância e conexão, bem como induziu maior acúmulo da organela na região perinuclear. Wang e colaboradores demonstraram que células de tumor estromal gastrointestinal (GIST) altamente proliferativas apresentavam um fenótipo de mitocôndrias mais alongadas que estava associado a um maior consumo de oxigênio e geração de ATP. Mais do que isso foi observado que o fenômeno era mediado pela inibição do recrutamento de DRP1, proteína efetora da fissão mitocondrial. A reversão desse perfil promoveu redução da

produção de ROS, proliferação e invasividade dessas células (J Wang et al. (2015)). Dentro das perspectivas do trabalho encontra-se caracterizar a modulação da melatonina na dinâmica mitocondrial em células de câncer gástrico através da avaliação da expressão dos marcadores citados.

Uma vez constatados que a melatonina exerceu um papel oncostático e de perturbação da homeostase mitocondrial em células de câncer gástrico, avaliamos se a melatonina poderia modular a indução de morte nessas células. Em concordância com a literatura, demonstramos que a melatonina induziu um aumento significativo de morte celular, em especial a apoptose. Entretanto, o papel pró apoptótico da melatonina em células tumorais é bem estabelecida na literatura, inclusive para células AGS. Os mecanismos associados a indução de apoptose em células de câncer gástrico incluem a ativação das vias MAPK (p38, JNK e ERK), da caspases 3 e 8, além do aumento da expressão das proteína BAX e redução da expressão de Bcl-2 (Weimin Li et al. (2015); Wang et al. (2017)). Nesse sentido, avaliou-se que a investigação da modulação outros perfis de mortes pela melatonina, ainda que minoritários, seriam de grande contribuição científica.

A crescente investigação acerca do papel dual da piroptose na tumorigênese despertou o interesse na caracterização desse processo em células de câncer gástrico. Shao e colaboradores demonstrou que tecidos tumorais apresentavam maior expressão de genes assinaturas relacionadas a piroptose do que tecidos adjacentes do mesmo paciente (Xueli Zhang et al. (2021)). No entanto, pouco se sabe acerca do impacto da piroptose na progressão tumoral no câncer gástrico. Ademais, recentes estudos têm demonstrado a capacidade da melatonina de atenuar a piroptose induzida por inflamassoma em diversas células não tumorais (Zhenjiang Liu et al. (2017); Jia-Ying Kang et al. (2022)). Contudo, até o momento da escrita dessa dissertação, não há dados publicados correlacionado o papel da melatonina na piroptose.

Neste estudo demonstramos pela primeira vez que a melatonina também foi capaz de atenuar eventos característicos da piroptose em células de câncer gástrico. Demonstramos que a melatonina diminuiu a expressão de proteínas efetoras da piroptose: Pró-caspase 1 e Gasdermina D. Em nosso trabalho, demonstramos que a melatonina promoveu um leve aumento e em seguida uma drástica redução da expressão da pró-caspase 1 em sua forma inativa. Não foram observadas bandas visíveis da expressão da caspase em sua conformação clivada. Como mencionado anteriormente, células AGS

naturalmente apresentam uma expressão de GSDMD diminuída (Wei Jie Wang et al. (2018)). Os nossos dados indicaram que o estímulo com melatonina induziu um leve aumento da expressão de GSDMD nos tempos iniciais de 3 e 6 horas e uma substancial redução após 24 horas de estímulo em ambas as concentrações testadas. A modulação de parâmetros como a sinalização e supressão transcricional de GSDMD é um dos mecanismos já descritos utilizados pela melatonina para promover a redução da piroptose em células adiposas e pulmonares (Zhenjiang Liu et al. (2017); Meng-Meng Xu et al. (2022); Zhenjiang Liu et al. (2017)).

Avaliamos, então, se a melatonina modularia a secreção do conteúdo citoplásmico marcadores de piroptose como a enzima LDH também utilizadas como marcadores da e da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Corroborando com os dados anteriores, a melatonina foi capaz de reduzir a secreção da LDH em diferentes tempos de estímulos. Curiosamente, houve um aumento significativo da produção de IL-1 β pelas células de câncer gástrico estimuladas com a concentração de 2.5mM em contraste a uma drástica redução em células estimuladas com a concentração de 5mM. Outro resultado surpreendente foi que as células de câncer gástrico apresentaram o mesmo padrão de produção da citocina inflamatória TNF-a observado para de IL-1 β quando estimuladas com as concentrações de melatonina citadas acima. A redução da secreção de IL-1 β é um evento esperado quando discutimos a atenuação da piroptose. No entanto, não podemos descartar as diversas vias de secreção atualmente descritas que podem justificar o aumento da sua produção em resposta a concentração de 2.5mM, dentre essas vias estão a secreção através de lisossomos, exossomos, microvesículas e vesículas autofágicas (Claudia Semino et al. (2018)). Bem como que a redução drástica da produção dessas citocinas em células estimuladas com a concentração de 5mM esteja relacionada a redução do número de células, uma vez que a concentração demonstrou ser altamente citotóxica para a AGS. Contudo, novos experimentos serão realizados a fim de caracterizar esse resultado.

Por fim, revelamos que a melatonina demonstrou ser capaz de prevenir a formação de poros na membrana plasmática em comparação às células não estimuladas de forma dose dependente. Nesse mesmo sentido, decidimos avaliar se esse efeito se manteria em um cenário de indução de formação de poros. A piroptose induzida por inflamassoma pode ser desencadeado através do estímulo com LPS e ATP. Adaptamos um

protocolo descrito na literatura em células AGS para avaliar a modulação da melatonina formação de poros em células de câncer gástrico (Sahar Sadat Sedeighzadeh et al. (2021)). Demonstramos que o pós tratamento de células AGS com melatonina foi eficiente na redução da formação de poros membranar induzido por LPS e ATP. É importante ressaltar que mesmo a melatonina induzindo aumento de morte de células AGS nas concentrações de 2.5 e 5mM, demonstramos que o processo não envolve a formação de poros na membrana plasmática. Mais do que isso, a melatonina previniu a formação de poros mesmo em condições de indução forçosa de poros.

Tendo em vista que a modulação de vias de morte ocorre de maneira multifatorial, diversas hipóteses foram levantadas acerca dos possíveis mecanismos desencadeados pela melatonina para a atenuação da piroptose em células de câncer gástrico. Como mencionado anteriormente, a modulação de parâmetros como a transcrição e sinalização da GSDMD são mecanismos já descritos como alvos da indolamina. Nesse mesmo sentido, hipotetizamos que a ação de supressão da piroptose exercida pela melatonina possa estar vinculado ao seu papel antioxidante. As ROS mitocondrial desempenham um importante papel na indução da piroptose uma vez que estas promovem a oligomerização da GSDMD, além de aparentar exercer um controle pós-clivagem na formação de poros na membrana plasmática (Charles L Evavold et al. (2021)). Em um novo mecanismo descrito como a oxidação da GSDMD propõe-se que a ROS mitocondriais induz a piroptose dependente do inflamassoma NLRP3, de modo que a neutralização dessas moléculas atenuaria a clivagem de GSDMD (Yufang Wang et al. (2019)). Em nosso trabalho, pudemos identificar que a ação de inibição da formação de poros ocorreu no mesmo período em que a produção de espécies reativas estava reduzida em comparação às células não estimuladas, reforçando a hipótese sugerida.

Outra hipótese relevante quando discutimos mortes líticas programadas é o recrutamento do complexo de reparo membranar, em especial o ESCRT III. A ESCRT III pode ser recrutada através do influxo de cálcio em decorrência da formação de poros por GSDMD. A inibição do complexo promove o aumento considerável da piroptose em células murinas e humanos (Ana Joaquina Jimenez et al. (2018)). Hipotetizamos que a melatonina possa atuar também através do recrutamento do complexo em resposta a piroptose. Para tal, pretendemos futuramente tratar as células de câncer gástrico com o

quelante de cálcio BAPTA, reagente amplamente utilizado como inibidor da ESCRT, e analisar se a melatonina seria ainda capaz de aliviar a piroptose nessas células.

7. Conclusão

Considerado os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- A melatonina reduz a viabilidade celular mitocondrial em células de câncer gástrico;
- A melatonina promove o aprisionamento de células na fase G1 e reduz a proliferação celular em células de câncer gástrico;
- A melatonina reduz a ativação celular através da redução da biogênese de corpúsculos lipídicos;
- A melatonina promove a redução da produção de espécies reativas nos tempos iniciais e, em sequência o aumento da produção de espécies reativas em tempo mais tardio, podendo caracterizar um estresse oxidativo;
- A melatonina promove alterações substanciais na morfologia, abundância, distribuição e interconexão mitocondrial. Tais modulações promoveram disfuncionalidade da respiração oxidativa de células de câncer gástrico;
- A melatonina induz aumento significativo fragmentação nuclear, ou seja, morte apoptótica em câncer gástrico;
- O estímulo com melatonina previne a formação de poros na membrana plasmática, mesmo após indução de poros com LPS e ATP;
- A melatonina também reduz a secreção de lactato desidrogenase por células de câncer gástrico;
- A melatonina reduz a expressão das proteínas efetoras GSDMD e pró-caspase 1 após 24 horas de estímulo;
- O estímulo com concentração de 2.5mM de melatonina promove aumento da produção de citocinas inflamatórias;

8. Produções Científicas

CERTIFICADO 

50 15 e 16 DEZEMBRO **XI SIMPÓSIO**
Instituto de Ciências Biológicas (IB) UnB Biologia Molecular

Certifico que o reconhecimento de melhor trabalho na grande área *Biologia Celular, Desenvolvimento e Câncer* foi concedido a **Sabrina Azevedo Machado** pelo trabalho intitulado **The role of melatonin on the modulation of mitochondrial function, inflammation, and carcinogenic parameters of human gastric cancer cells** no XI Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, 16 de dezembro de 2022


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol - IB - UnB

9. Referência Bibliográfica:

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. *et al.* Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 16, p. 2997 – 3025, 2 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Signs and Symptoms of Stomach Cancer | Gastric Cancer Warning Signs**, 2021a. Website. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-symptoms.html>. Acesso em: 11/09/2022.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment Choices Based on the Extent of Stomach Cancer**. 2021b. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/treating/by-stage.html>. Acesso em: 11/09/2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informações Técnicas/alerta GGMON 05/2022 (Nutrivigilância). **Riscos associados ao consumo de suplementos alimentares contendo melatonina**. Setembro 2022.

ANVISA. Instrução Normativa- IN no 28, de 26 de julho de 2018. **Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares**, p. 1 – 48, 2018.

ARCHER, S. L. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. **N Engl J Med**, v. 369, n. 23, p. 2236 – 2251, 2013.

ARENDDT, J. Melatonin. **Encycl Endocr Dis**, v. 7, n. August, p. 63 – 74, 2018.

BERGHE, T. V. *et al.* Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117 – 129, 6 2013.

BISHEHSARI, F.; VOIGT, R. M.; KESHAVARZIAN, A. Circadian rhythms and the gut microbiota: from the metabolic syndrome to cancer. **Nat Rev Endocrinol**, v. 16, n. 12, p. 731 – 739, 2020.

BIZZARRI, M. *et al.* Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: A review. **Expert Opin Ther Targets**, v. 17, n. 12, p. 1483 – 1496, 2013.

Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem.**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CANLI, O. *et al.* Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. **Cancer Cell**, v. 32, n. 6, p. 869 – 883.e5, 12 2017.

CARBAJO-PESCADOR, S. *et al.* Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. **J Pineal Res**, v. 51, n. 4, p. 463 – 471, 2011.

CHAABANE, W. *et al.* Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, p. 43 – 58, 02 2013.

CHEN, X. *et al.* Melatonin inhibits lung cancer development by reversing the Warburg effect via stimulating the SIRT3/PDH axis. **J Pineal Res**, v. 71, n. 2, 9 2021.

CHEUNG, E. C.; VOUSDEN, K. H. The role of ROS in tumour development and progression. **Nat Rev Cancer**, v. 22, p. 280 – 297, 2022.

CHOK, K. C. *et al.* Melatonin Induces Autophagy via Reactive Oxygen Species-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Colorectal Cancer Cells. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5038 –, 2021.

CIPOLLA-NETO, J. *et al.* Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **J Pineal Res**, v. 56, n. 4, p. 371 – 381, 5 2014.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. D. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. **Endocr Rev**, v. 39, n. 6, p. 990-1028, 2018.

CLAUDIA, A. *et al.* Clinical impact of melatonin on breast cancer patients undergoing chemotherapy; effects on cognition, sleep and depressive symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **PLoS One**, v. 15, n.4, 2020.

DOWNS, K. P. *et al.* An overview of the non-canonical inflammasome. **Mol Aspects Med**, v. 76, p. 100924 –, 2020.

ERNST, O.; Zor, T. Linearization of the Bradford Protein Assay. **JoVE** 2010, No. 38, 1918.<https://doi.org/10.3791/1918>.

EVAVOLD, C. L. *et al.* Control of gasdermin D oligomerization and pyroptosis by the Ragulator-Rag-mTORC1 pathway. **Cell**, v. 184, n. 17, p. 4495 – 4511, 2021.

FANG, Y. *et al.* Pyroptosis: A new frontier in cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 121, 2020.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 1907 – 1916, 2005.

FIORILLO, M. *et al.* High ATP Production Fuels Cancer Drug Resistance and Metastasis: Implications for Mitochondrial ATP Depletion Therapy. **Front. Oncol.**, v. 11, n. 2021, 2021.

FISCHER, T. W. *et al.* Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. **J Pineal Res**, v. 54, n. 3, p. 303 – 312, 4 2013.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell death & differentiation**, v. 25, p. 486 – 541, 01 2018.

GONZÁLEZ, A. *et al.* Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. **Oncol Rep.**, v. 17, n. 4, p. 947 – 953, 2007.

GREENMAN, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 153 – 158, 3 2007.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, v. 12, n. 1, p. 31 – 46, 1 2022.

HICKIE, I. B.; ROGERS, N. L. Novel melatonin-based therapies: potential advances in the treatment of major depression. **Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 621 – 631, 8 2011.

HICKMAN, A. B.; KLEIN, D. C.; DYDA, F. Melatonin Biosynthesis: The Structure of Serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 Å Resolution Suggests a Catalytic Mechanism. **Mol Cell**, v. 3, n. 1, p. 23 – 32, 1 1999.

HOITZING, H.; JOHNSTON, I. G.; JONES, N. S. What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research. **Bioessays**, v. 37, p. 687 – 700, 2015.

INCA. **Estimativa 2020**: Incidência de Cancer no Brasil. RIO DE JANEIRO: Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Área de Edição e Produção de Materiais Técnico- -Científicos, 2020. 120 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 05/08/2021.

INCA. **Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 11/09/2022.

JIA, D. *et al.* Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 9, p. 3909 – 3018, 2018.

JIMENEZ, A. J. *et al.* ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. **Science**, v. 362, n. 6417, p. 956 – 960, 2018.

KANG, J. *et al.* Melatonin attenuates LPS-induced pyroptosis in acute lung injury by inhibiting NLRP3-GSDMD pathway via activating Nrf2/HO-1 signaling axis. **Int Immunopharmacol**, v. 109, n. 108782, 2022.

KARASEK, M.; WINCZYK, K. Melatonin in Humans. **N Engl J Med**, v. 57, n. SUPPL. 5, p. 19 – 39, 1997.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol**, v. 70, n. 5, p. 1469 – 1480, 2006.

KUMAR, J.; HALDAR, C.; VERMA, R. Melatonin Ameliorates LPS-Induced Testicular Nitro-oxidative Stress (iNOS/TNF α) and Inflammation (NF-kB/COX-2) via Modulation of SIRT-1. **Reprod Sci**, v. 28, n. 12, p. 3417 – 3430, 12 2021.

LI, W. *et al.* Melatonin Induces Cell Apoptosis in AGS Cells Through the Activation of JNK and P38 MAPK and the Suppression of Nuclear Factor-Kappa B: a Novel Therapeutic Implication for Gastric Cancer. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, n. 6, p. 2323 – 2338, 2015.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211 – 218, 3 2016. ISSN 0968-0004.

LINGAPPAN, K. NF- κ B in oxidative stress. **Curr Opin Toxicol**. v. 7, p. 81 – 86, 2 2018.

LIU, C.; JIN, Y.; FAN, Z. The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer. **Front Oncol**, v. 11, p. 3408 –, 9 2021.

LIU, J. *et al.* MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 56, p. 361 – 383, 1 2016.

LIU, L. *et al.* Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G2 /M phase arrest in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19. **J Pineal Res** v. 50, n. 2, p. 222 – 231, 2011.

LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther.**, v. 2, n. 1, p. 1 – 9, 7 2017a.

LIU, Z. *et al.* Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF- κ B/GSDMD signal in mice adipose tissue. **J Pineal Res**, v. 63, n. 1, p. e12414 –, 8 2017b.

MA, Z. *et al.* Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 46768 – 46784, 4 2016.

MARTÍN-RENEADO, J. *et al.* Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. **J Pineal Res**, v. 45, n. 4, p. 532 – 540, 2008.

MARTIN, W. F.; GARG, S.; ZIMORSKI, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 370, n. 1678, p. 20140330 –, 9 2015.

- MENG, X. *et al.* Dietary Sources and Bioactivities of Melatonin. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 367 – 431, 2017.
- MINOCHA, T. *et al.* Melatonin induces apoptosis and cell cycle arrest in cervical cancer cells via inhibition of NF- κ B pathway. **Inflammopharmacol**, v. 30, p. 1411 – 1429, 2022.
- MORGAN, E. *et al.* The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. **E Clinical Medicine**, v. 47, 5 2022.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J.**, v. 417, n. Pt 1, p. 1 –, 13, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 7. ed. New York, NY: W.H. Freeman, 2017. ISBN 9781319108243.
- NYAMSAMBUU, A. *et al.* Molecular mechanism of inhibitory effects of melatonin on prostate cancer cell proliferation, migration and invasion. **Plos one**, v. 17, n. 1, p. 1 – 20, 2022.
- PARIENTE, R. *et al.* Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 80, n. 5, p. 985 – 998, 11 2017.
- RAHMAN, I.; Kode, A.; Biswas, S. K. Assay for Quantitative Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method. **Nat Protoc**, v.1, n.6, p.3159–3165, 2006.
- REEST, J. V. D. *et al.* Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. **Nat commun.**, v. 9, n. 1, p. 1 – 16, 4 2018.
- REHMAN, J. *et al.* Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. **The FASEB Journal**, Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 26, n. 5, p. 2175 – 2186, 5 2012. ISSN 0892-6638.
- REITER, R. J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. **Endocr Rev.**, v. 12, n. 2, p. 151 – 180, 5 1991.
- REITER, R. J. *et al.* Melatonin and Its Relation to the Immune System and Inflammation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 917, n. 1, p. 376 – 386, 1 2000.
- REITER, R. J. *et al.* Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **J Pineal Res.**, v. 61, n. 3, p. 253 – 278, 10 2016.
- REITER, R. J. *et al.* Melatonin inhibits Warburg-dependent cancer by redirecting glucose oxidation to the mitochondria: a mechanistic hypothesis. **Cell Mol Life Sci.**, v. 77, n. 13, p. 2527 – 2542, 1 2020.
- ROCK, C. L. *et al.* American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. **CA Cancer J Clin.**, v. 70, n. 4, p. 245 – 271, 7 2020.
- ROVERE-QUERINI, P. *et al.* HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. **EMBO Reports**, v. 5, n. 8, p. 825 – 830, 8 2004.
- SAKAMOTO, K. *et al.* Role of the Tumor Suppressor PTEN in Antioxidant Responsive Element-mediated Transcription and Associated Histone Modifications. **Molecular Biology of the Cell**, The American Society for Cell Biology, v. 20, n. 6, p. 1606 – 1617, 3 2009. ISSN 1059-1524.
- SANCHEZ-BARCELO, E. *et al.* Clinical Uses of Melatonin: Evaluation of Human Trials. **Curr Med Chem.**, v. 17, n. 19, p. 2070 – 2095, 5 2010.

SANCHEZ-SANCHEZ, A. M. *et al.* Melatonin Cytotoxicity Is Associated to Warburg Effect Inhibition in Ewing Sarcoma Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135420 – , 8 2015.

SCHOMERUS, C.; KORF, H. W. Mechanisms Regulating Melatonin Synthesis in the Mammalian Pineal Organ. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1057, n. 1, p. 372 – 383, 12 2005.

SEDEIGHZADEH, S. S. *et al.* The Endocannabinoid, Anandamide, Acts as a Novel Inhibitor of LPS-Induced Inflammasome Activation in Human Gastric Cancer AGS Cell Line: Involvement of CB1 and TRPV1 Receptors. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, n. 6698049, 2021.

SEMINO, C. *et al.* Progressive waves of IL-1 β release by primary human monocytes via sequential activation of vesicular and gasdermin D-mediated secretory pathways. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 1088, p. 1 – 14, 2018.

SHARMA, A.; BOISE, L. H.; SHANMUGAM, M. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1144 – , 8 2019.

SHEN, C. *et al.* Melatonin Suppresses the Growth of Ovarian Cancer Cell Lines (OVCAR-429 and PA-1) and Potentiates the Effect of G1 Arrest by Targeting CDKs. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 176 – 187, 2016.

SHIU, S. Y. W. *et al.* Melatonin MT1 receptor-induced transcriptional up-regulation of p27(Kip1) in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF- κ B): potential implications on prostate cancer chemoprevention and therapy. **J Pineal Res**, v. 54, n. 1, p. 69 – 79, 2013.

SITARZ, R. *et al.* Cancer Management and Research Dovepress Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. **Cancer Manag Res.**, p. 10 – 239, 2018.

SLOMINSKI, R. M. *et al.* Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Mol Cell Endocrinol.** v. 351, n. 2, p. 152 – 166, 2012.

SONG, J. *et al.* Melatonin induces the apoptosis and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells via blockade of the AKT/MDM2 pathway. **Oncol Rep**, v. 39, n. 4, p. 1975 – 1983, 2018.

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. Modifiable risk factors for cancer. v. 90, n. 2, p. 299 – , 1 2004.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, p. 209 – 249, 2 2021.

SUOFU, Y. *et al.* Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 114, n. 38, p. E7997 – E8006, 9 2017.

TAMARKIN, L. *et al.* Melatonin Inhibition and Pinealectomy Enhancement of 7,12- Dimethylbenz(a) anthracene-induced Mammary Tumors in the Rat. **Cancer Research**, v. 41, n. 11, p. 4432 – 4436, November 1981.

TAN, Y. *et al.* Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer. **J Exp Clin Cancer Res.**, v. 40, n. 1, p. 1 – 15, 12 2021.

TIETZE, F. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. **Anal Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TILOKANI, L. *et al.* Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, p. 341 – 360, 2018.

- WANG, J. *et al.* Nestin regulates proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumor cells by altering mitochondrial dynamics. **Oncogenes**, v. 35, p. 3139 – 3150, 2015a.
- WANG, R. X. *et al.* Involvement of nuclear receptor RZR/ROR γ in melatonin-induced HIF-1 α inactivation in SGC-7901 human gastric cancer cells. **Oncol Rep.**, v. 34, n. 5, p. 2541 – 2546, 11 2015b.
- WANG, W. J. *et al.* Downregulation of gasdermin D promotes gastric cancer proliferation by regulating cell cycle-related proteins. **J Dig Dis.**, v. 19, n. 2, p. 74 – 83, 2018.
- WANG X, Fu Z, Chen Y and Liu L: Fas expression is downregulated in gastric cancer. **Mol Med Rep.** v. 15, n. 2, p.627-634, 2017.
- WANG, Y. *et al.* Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. **J Mol Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 1069 – 1082, 2019.
- WILSON, S. T.; BLASK, D. E.; LEMUS-WILSON, A. M. Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 75, n. 2, p. 669 – 670, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2022.
- XIE, Q. *et al.* Mitochondrial Control by DRP1 in Brain Tumor Initiating Cells. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 501 – 510, 4 2015. ISSN 1097-6256.
- XU, M. *et al.* Melatonin Suppresses Macrophage M1 Polarization and ROS-Mediated Pyroptosis via Activating ApoE/LDLR Pathway in Influenza A-Induced Acute Lung Injury. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2022, n. 2520348, p. 1 – 32, 2022.
- YANG, P. *et al.* Overweight, obesity and gastric cancer risk: Results from a meta- analysis of cohort studies. **Eur J Cancer**, v. 45, n. 16, p. 2867 – 2873, 11 2009.
- ZHA, Q. *et al.* ATP-Induced Inflammasome Activation and Pyroptosis Is Regulated by AMP-Activated Protein Kinase in Macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 7, n. 597, p. 1 – 16, 2016.
- ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2016, 2016.
- ZHANG, X. *et al.* The Pyroptosis-Related Signature Predicts Prognosis and Indicates Immune Microenvironment Infiltration in Gastric Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, p. 1512 – 1529, 2021.
- ZHAO, D. *et al.* Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. **Front Endocrinol.**, v. 10, p. 249 –, 4 2019.
- ZOU, P. *et al.* Coordinated Upregulation of Mitochondrial Biogenesis and Autophagy in Breast Cancer Cells: The Role of Dynamin Related Protein-1 and Implication for Breast Cancer Treatment. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, n. 4085727, p. 1 – 20, 2016.

