



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**O papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos e na morte
piroptótica em células de adenocarcinoma pancreático humanas**

Sarah Pinho Bezerra

Brasília, 2024



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Sarah Pinho Bezerra

**O papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos e na morte
piroptótica em células de adenocarcinoma pancreático humanas**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biologia Molecular,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília, 2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB574p Bezerra, Sarah Pinho
O papel da melatonina na modulação de parâmetros
carcinogênicos e na morte piroptótica em células de
adenocarcinoma pancreático humanas / Sarah Pinho Bezerra;
orientador Kelly Grace Magalhães. -- Brasília, 2024.
80 p.

Dissertação(Mestrado em Biologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. Adenocarcinoma pancreático. 2. Melatonina. 3. Efeito
antitumoral. 4. Piroptose. I. Magalhães, Kelly Grace,
orient. II. Título.

Sarah Pinho Bezerra

**O papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos e na morte
piroptótica em células de adenocarcinoma pancreático humanas**

Data: 05/03/2024

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)

Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular - Universidade de Brasília (UnB)

Prof.^a Dra. Sônia Nair Bão (Membro interno)

Universidade de Brasília (UnB)

Prof.^a Dra. Valéria de Matos Borges (Membro externo)

Fundação Oswaldo Cruz – Bahia (Fiocruz – BA)

Prof.^a Dra. Raquel das Neves Almeida (Membro suplente)

Universidade Federal de Goiás (UFG)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me capacitou, sustentou e me permitiu viver mais essa etapa. Obrigada, Senhor, por me fortalecer e conduzir durante esse período e em todos os momentos da minha vida. Sinto-me abençoada.

Agradeço à minha família, em especial meus pais Sandy e Maria do Socorro, que são minha rede de apoio e incentivo. Obrigada por me apoiarem em todas as minhas decisões, por todo amor, investimento e cuidado. Sem vocês eu não conseguiria. À minha irmã Samira por sempre me incentivar e acreditar em mim e pelo melhor presente que ela poderia ter me dado: Rachel. Ao meu namorado Filipe, por toda paciência e compreensão. Obrigada por entender as minhas ausências e ser sempre um conforto.

Agradeço a minha orientadora Kelly, que acreditou em mim e me acolheu sem mesmo me conhecer. Fui muito feliz na minha escolha e sou grata pelo privilégio de ser orientada por uma pessoa tão inspiradora. Muito obrigada, professora, por me ensinar com amor e excelência.

Com carinho, agradeço ao LIMI, que me abraçou e me permitiu aprender e ensinar. Me sinto acolhida e feliz por fazer parte desse laboratório, sou grata a todos os amigos que também posso chamar de colegas de trabalho. Em especial, agradeço a minha amiga Débora, que com paciência me ensinou e me acompanhou tanto nos almoços quanto nos experimentos, sinto saudades! Ao meu amigo Gabriel Pasquarelli, que sempre solícito compartilhou comigo seu amplo conhecimento, principalmente com as técnicas de citometria, um verdadeiro professor. A minha amiga Sabrina, que além de psicóloga, me ajudou, aconselhou e ensinou, devo muito as suas contribuições tanto pessoais quanto científicas. Às minhas filhas da ciência, Nathalia e Clarissa, obrigada por aceitarem se aventurar comigo nesse projeto, contar com vocês tornou tudo mais leve, sou muito grata por toda parceria e apoio. Às minhas amigas Fernanda, Heloisa, Júlia e Milena sou muito grata por toda troca, carinho e companhia, trabalhar com vocês é um privilégio. Ao Ramon, Calixto e Jader por serem sempre solícitos, por todas as trocas e aprendizado. Também ao Felipe, que o considero como do meu laboratório, obrigada pela convivência agradável e por toda ajuda. Agradeço também ao Chiquinho, que esteve sempre disposto a ajudar e contribuiu significativamente para o desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade de Brasília, especialmente ao Instituto de ciências biológicas, sou grata pelo ensino de excelência e pelas oportunidades.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e as agências de fomento CAPES, FAPDF e CNPQ por todo auxílio financeiro prestado.

RESUMO

O adenocarcinoma pancreático é a neoplasia maligna mais frequente do pâncreas e representa uma das formas mais letais de câncer do mundo, sem opções de tratamento eficazes para estágios avançados. Possui um microambiente tumoral imunossupressor que contribui para resistência à terapia convencional. Tais limitações têm motivado a busca por terapias alternativas, incluindo o uso de suplementos e compostos naturais. A melatonina está emergindo como uma terapia adjuvante promissora, não apenas aliviando os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia, mas também demonstrando efeitos antiproliferativos em diversos tipos de câncer. Contudo, há uma lacuna significativa no conhecimento sobre o papel da melatonina nos processos celulares e na morte celular piroptótica em células de câncer de pâncreas. Assim, este estudo se propõe a investigar os efeitos da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos e na morte por piroptose em células humanas de adenocarcinoma pancreático (PANC-1) *in vitro*. As células PANC-1 foram estimuladas com concentrações distintas de melatonina (0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM) por diferentes períodos. Parâmetros carcinogênicos como viabilidade e ciclo celular, fragmentação nuclear, proliferação e biogênese de corpúsculos lipídicos foram avaliados. Análises para caracterizar a morte celular por piroptose também foram realizadas como a formação de poros na membrana plasmática, liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), ativação de caspase-1, perfil de secreção de citocinas, acidificação lisossomal e geração de espécies reativas (ROS), bem como abundância mitocondrial. Nossos resultados revelaram que a melatonina modulou parâmetros carcinogênicos induzindo citotoxicidade de maneira dose e tempo-dependente e o aprisionamento na fase G0/G1 do ciclo celular, reduzindo a proliferação celular e a biogênese de corpúsculos lipídicos. A morte celular piroptótica foi evidenciada pela perda da integridade da membrana plasmática, liberação de LDH e ativação de caspase-1, além de um aumento na produção de ROS e danos lisossomais e mitocondriais. Este estudo destaca o potencial efeito antitumoral da melatonina *in vitro*, abrindo novas perspectivas para seu uso como adjuvante no tratamento do câncer pancreático.

Palavras-chave: Adenocarcinoma pancreático, Melatonina, Efeito antitumoral, Piroptose

ABSTRACT

Pancreatic adenocarcinoma is the most common malignant neoplasm of the pancreas and represents one of the most lethal forms of cancer in the world, with no effective treatment options for advanced stages. It has an immunosuppressive tumor microenvironment that contributes to resistance to conventional therapy. These limitations have motivated the research for alternative therapies, for example use of supplements and natural compounds. Melatonin is emerging as a promising adjuvant therapy, not only alleviating the side effects of chemotherapy and radiotherapy, but also demonstrating antiproliferative effects in various types of cancer. However, there is a significant gap in knowledge about the role of melatonin in cellular processes and pyroptotic cell death in pancreatic cancer cells. Therefore, this study aims to investigate the effects of melatonin on the modulation of carcinogenic parameters and pyroptotic cell death in human pancreatic adenocarcinoma cells (PANC-1) *in vitro*. PANC-1 cells were stimulated with different concentrations of melatonin (0.625mM, 1.25mM, 2.5mM, 3.75mM and 5mM) for different periods. Carcinogenic parameters such as viability and cell cycle, nuclear fragmentation, proliferation and lipid droplets biogenesis were evaluated. Analyses to characterize cell death by pyroptosis were also carried out, such as the membrane pore formation, release of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), activation of caspase-1, cytokine secretion profile, lysosomal acidification and generation of reactive species (ROS), as well as mitochondrial abundance. Our results revealed that melatonin modulated carcinogenic parameters by inducing cytotoxicity in a dose-and time-dependent manner and arresting the cell cycle at the G1/G0 phase, reducing cell proliferation and biogenesis of lipids droplets. Cell death by pyroptosis was also observed, evidenced by reduced plasma membrane integrity, LDH release and caspase-1 activation, as well as an increase in ROS production and lysosomal and mitochondrial damage. This study highlights the potential antitumor effect of melatonin *in vitro*, unveiling new perspectives for its use as an adjuvant in the treatment of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic adenocarcinoma, Melatonin, Antitumor effect, Pyroptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- O microambiente tumoral do adenocarcinoma ductal pancreático.....	17
Figura 2- Mapa global com taxa de mortalidade do câncer de pâncreas expresso em números absolutos.	18
Figura 3 - Etapas da síntese de melatonina na glândula pineal.	21
Figura 4 - Mecanismos da piroptose, via canônica e não canônica.....	27
Figura 5 - Vias de sinalização da piroptose associada ao câncer.	28
Figura 6 - Estratégia de gate em citometria de fluxo para células viáveis e singlets para análise de proliferação celular por CFSE.	34
Figura 7- A melatonina reduziu a viabilidade celular das células PANC-1.....	41
Figura 8 - A melatonina induz morte lítica em células PANC-1.....	43
Figura 9 - A melatonina aprisionou as células PANC-1 na fase G1 e reduziu as células em fase S do ciclo celular.....	44
Figura 10-A melatonina induziu a fragmentação nuclear de maneira dose-dependente em células PANC-1.....	45
Figura 11-A melatonina reduz a proliferação de células PANC-1.....	46
Figura 12- Redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, análise por espectrofotometria..	47
.....	
Figura 13- Redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, análise por microscopia de luz.	48
.....	
Figura 14 - Redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, análise por citometria de fluxo.	48
.....	
Figura 15 - A melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos em células PANC-1.	49
Figura 16 - A melatonina induz a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1 de maneira dose dependente.	51
Figura 17 - A melatonina induz a secreção da enzima LDH em células PANC-1.....	52
Figura 18 - A melatonina induziu a ativação de Caspase-1 em células PANC-1.	53
Figura 19 - A melatonina não modulou a secreção de citocinas IL-1 β e IL-6, mas aumentou a secreção de TNF- α pelas células PANC-1 em 24h.....	54
Figura 20 - A melatonina aumenta a acidificação lisossomal em células PANC-1.	54
Figura 21 - A melatonina aumentou a geração de espécies reativas no curso do tempo, em 6h, de maneira dose dependente..	56

Figura 22 - A inibição da geração de espécies reativas inibiu a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1..	58
Figura 23 - A melatonina reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio após 24h de estímulo.	59
Figura 24 - A melatonina altera a abundância mitocondrial de células PANC-1.....	60
Figura 25. O Papel da melatonina em células de adenocarcinoma pancreático humano PANC-1.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HTR	5-hidroxitriptofano descarboxilase
AANAT	Arilalquilamina-N-Acetiltransferase
ADP	Adenocarcinoma Ductal Pancreático
AFMK	N-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
AMK	N-acetil-5-metoxiquinuramina
APAF-1	Fator ativador da protease apoptótica 1
ASMT	N-acetilserotonina-O-metiltransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	Proteína X associada a bcl-2
Bcl-2	Proteína 2 do linfoma de células B
CAFs	Fibroblastos Associados Ao Câncer
CDK	Quinases dependentes de ciclina
CDKN2A	Inibidor De Quinase Dependente De Ciclina 2A
CFSE	Éster succinimidil de carboxifluoresceína
CLs	Corpúsculos Lipídicos
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DCF-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GSDM	Gasdermina
GSDMB	Gasdermina B
GSDMC	Gasdermina C
GSDMD	Gasdermina D
GSDME	Gasdermina E
GzmA	Granzima A
GzmB	Granzima B
HIF1- α	Fator 1- α Induzível Por Hipóxia
HIOMT	hidroxi-indole-O-metiltransferase

HMGB1	Proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina-2
IL-27	Interleucina-27
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
KRAS	Oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas Quinases ativadas por mitogenos
mM	Milimolar
MT1	Receptor de melatonina 1
MT2	Receptor de melatonina 2
MT3	quinona redutase II
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NAC	N-Acetilcisteína
NF-K β	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PanIN	Neoplasia Intraepitelial Pancreática
PBS	Tampão fosfato-salino
PEG	Propilenoglicol
PI	Iodeto de propídeo
PI3Ks	Fosfoinositídeo 3-quinase
PRRs	Receptores de reconhecimento padrões
PSCs	Células Estreladas Pancreáticas

RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
ROR	Receptor órfão retinóide
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SMAD4	Membro da família SMAD4
TAK1	Quinase 1
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TNFR	Receptores de morte transmembrana
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP53	Proteína tumoral p53
TPH	Triptofano-5-hidroxilase
UCP1	Proteína desacopladora 1
μg	Micrograma
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Câncer	15
1.2. Câncer de Pâncreas	16
1.3. Melatonina	20
1.4. Morte celular	23
1.5. Piroptose	25
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. METODOLOGIA	31
4.1. Cultivo celular.....	31
4.2. Estímulo com melatonina	31
4.3. Análise da viabilidade celular mitocondrial	31
4.4. Análise do perfil de morte celular.....	32
4.5. Análise de progressão do ciclo celular e fragmentação nuclear	33
4.6. Análise de proliferação celular	33
4.7. Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos.....	34
4.8. Análise de formação de poros na membrana plasmática	36
4.9. Análise da liberação de LDH.....	36
4.10. Análise da ativação de Caspase-1	37
4.11. Análise do perfil de secreção de citocinas	37
4.12. Análise da acidificação lisossomal.....	38
4.13. Análise de geração de espécies reativas de oxigênio	38
4.14. Análise de formação de poros na membrana plasmática e do papel de ROS nesse processo.....	39
4.15. Análise da abundância mitocondrial	40

5. RESULTADOS.....	41
5.1. A melatonina reduziu a viabilidade celular mitocondrial das células PANC-1 de maneira dose e tempo-dependente	41
5.2. A melatonina induz morte lítica em células PANC-1.....	42
5.3. A melatonina aprisionou as células PANC-1 na fase G1 e reduziu as células em fase S do ciclo celular	44
5.4. A melatonina induziu a fragmentação nuclear de maneira dose-dependente em células PANC-1	45
5.5. A melatonina reduz a proliferação de células PANC-1	46
5.6. A melatonina reduziu corpúsculos lipídicos em células PANC-1	47
5.7. A melatonina induz a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1 de maneira dose dependente.	50
5.8. A melatonina induz a secreção da enzima LDH em células PANC-1	52
5.9. A melatonina induziu a ativação de Caspase-1 em células PANC-1.....	52
5.10. A melatonina não modulou a secreção de citocinas IL-1 β e IL-6, mas aumentou a secreção de TNF- α pelas células PANC-1 em 24h.....	53
5.11. A melatonina aumenta a acidificação lisossomal em células PANC-1.....	54
5.12. A melatonina aumentou a geração de espécies reativas no curso do tempo, em 6h, de maneira dose dependente em células PANC-1	55
5.13. A inibição da geração de espécies reativas inibiu a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1.....	57
5.14. A melatonina reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio em células PANC-1 após 24h.....	58
5.15. A melatonina altera a abundância mitocondrial de células PANC-1	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer, tumores malignos e neoplasias malignas são sinônimos utilizados para descrever um conjunto de doenças que têm como principais características o crescimento anormal e descontrolado de células, podendo ter sua origem em diversos tecidos ou órgãos (Weinberg, 2016). As células cancerosas exibem falhas nos mecanismos reguladores que controlam a proliferação celular normal e a manutenção da homeostase. Essas falhas incluem autossuficiência em sinais de crescimento, evasão das vias de morte e senescência celular, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese, invasão tecidual, reprogramação metabólica e evasão do sistema imune (Hanahan, 2022). Isso se deve a um processo multifatorial que é desencadeado principalmente por predisposições genéticas e causas ambientais (NCI, 2021).

A invasão de tecidos próximos e a disseminação de células cancerosas em locais distantes do tumor primário original é denominada metástase. A metástase é a principal causa de morte para mais de 90% dos pacientes diagnosticados com câncer (Fares *et al.*, 2020).

A maioria dos cânceres exibem um alto grau de heterogeneidade intratumoral, originada tanto por alterações genéticas e epigenéticas de origem hereditária e aleatória, quanto por variações no interior do tumor. Subpopulações heterogêneas, coexistentes e competindo por recursos limitados, podem participar de interações complexas que impactam a tumorigênese, a progressão da doença e os resultados terapêuticos (Tabassum e Polyak, 2015).

O câncer é uma das principais causas de óbito e representa um desafio significativo para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020, o câncer foi responsável por quase 10 milhões de mortes, afetando aproximadamente uma a cada seis pessoas (WHO, 2021). O câncer se posiciona como a primeira ou segunda principal causa de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países, ocupando o terceiro ou quarto lugar em outros 23 países. A crescente prevalência do câncer como a principal razão de óbito reflete, em parte, declínios notáveis nas taxas de mortalidade por acidentes vasculares cerebrais e doenças coronárias, quando comparadas com o câncer, em diversas nações (Sung *et al.*, 2021).

Diversos fatores influenciam a escolha do tratamento do câncer, como tipo e estágio do câncer, estado geral de saúde do paciente e disponibilidade de tratamento. As abordagens terapêuticas mais comuns atualmente compreendem a cirurgia, quimioterapia,

radioterapia, transplante de medula óssea e imunoterapia. Geralmente, é realizada uma terapia combinada, onde são associados mais de um tipo de tratamento. Contudo, as limitações desses métodos, como a resistência à terapia e a capacidade das células cancerosas de evadir a resposta imunológica, destacam a necessidade de abordagens mais eficientes diante da complexidade do câncer. Em particular, tais terapias revelam-se menos eficazes para o tratamento de tumores secundários, em caso de metástases, que em sua maioria não fornecem resultados satisfatórios (Yahya e Alqadhi, 2021).

1.2. Câncer de Pâncreas

O pâncreas é um importante órgão glandular envolvido em dois processos fisiológicos principais: digestão e metabolismo da glicose, tratando-se de um órgão exócrino e endócrino. A porção exócrina do pâncreas consiste em células acinares e ductais. As células acinares produzem enzimas digestivas e constituem a maior parte do tecido pancreático juntamente com os ductos formados por células epiteliais. Já o pâncreas endócrino compreende as células das ilhotas pancreáticas, ou ilhotas de Langerhans, que produzem e secretam hormônios como insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático na corrente sanguínea, responsáveis pela homeostase da glicose (Bardeesy e DePinho, 2002).

A maioria das neoplasias malignas do pâncreas são adenocarcinomas. Neoplasias pancreáticas raras incluem tumores neuroendócrinos (que podem secretar hormônios como insulina ou glucagon) e carcinomas acinares. Neoplasias ainda menos comuns incluem carcinomas colóides, pancreatoblastomas e neoplasias pseudopapilares sólidas (Kleeff *et al.*, 2016).

Aproximadamente 90% dos cânceres pancreáticos são caracterizados como adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), originando-se de células ductais, embora sugira-se que outros tipos celulares também possam estar envolvidos (Wang *et al.*, 2021).

O ADP apresenta um microambiente tumoral altamente imunossupressor, caracterizado por um estroma desmoplásico denso, que impede o fluxo sanguíneo para a área, inibe a administração de medicamentos e suprime a resposta imune antitumoral. Além disso, o ambiente hipóxico, o pH extracelular ácido e a alta pressão do líquido intersticial também atuam para aumentar a carcinogênese e a progressão do câncer (Truong e Pauklin, 2021). Os componentes do microambiente tumoral do ADP interagem entre si e com as células cancerosas (Figura 1) de maneira favorável a ativação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e das células estreladas pancreáticas (PSCs) que são ativadas por estresse

ambiental (estresse oxidativo e hipóxia), fatores celulares (IL-1, IL-6, fator induzível por hipóxia 1- α (HIF1- α) e TGF- β) levando ao aumento da fibrose sustentada e da angiogênese tumoral (Looi *et al.*, 2019).

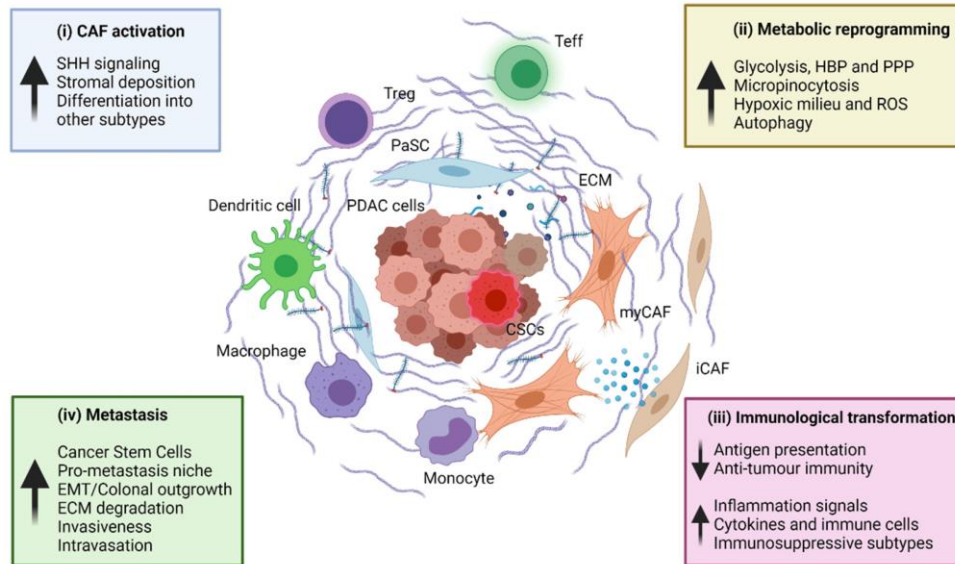


Figura 1- O microambiente tumoral do adenocarcinoma ductal pancreático. O adenocarcinoma ductal pancreático apresenta alta heterogeneidade em seus componentes celulares e acelulares, influenciando a interação entre as células tumorais, fibroblastos e células imunológicas no microambiente tumoral. Essa interação promove um ambiente pró-tumoral, caracterizado pela ativação de fibroblastos associados ao câncer, reprogramação metabólica, alterações no sistema imunológico e eventos que promovem metástases precoces. Fonte: (Truong e Pauklin, 2021)

O ADP é um dos tipos de câncer mais letais do mundo (Figura 2), segundo GLOBOCAN 2020, é a sétima principal causa de morte global relacionada ao câncer (Sung *et al.*, 2021). Apesar do avanço no conhecimento dos potenciais fatores de risco associados e das novas ferramentas disponíveis para o diagnóstico precoce, o ADP tem um prognóstico muito ruim, normalmente após o diagnóstico, apenas 24% das pessoas sobrevivem 1 ano e a taxa de sobrevivência em 5 anos ainda é inferior a 10% (Rawla, Sunkara e Gaduputi, 2019). No Brasil, estima-se a incidência de 10.980 novos casos a cada 100 mil habitantes no triênio de 2023-2025 (Santos *et al.*, 2023). No mundo estima-se um aumento na incidência de aproximadamente 62% e um aumento de aproximadamente 65% dos números de mortes até 2040, evidenciando a alta letalidade do câncer de pâncreas (WHO, 2021).

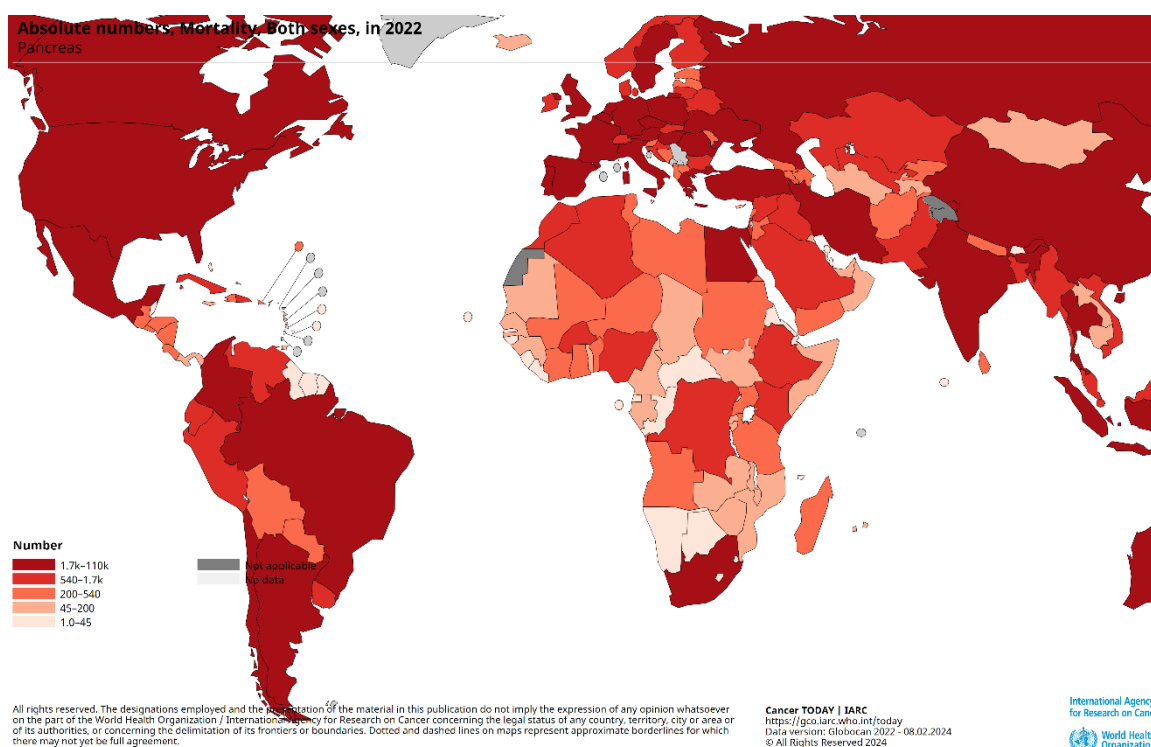


Figura 2- Mapa global com taxa de mortalidade do câncer de pâncreas expresso em números absolutos. O mapa de calor mostra as taxas de mortalidade em números absolutos para câncer de pâncreas em todo o mundo em 2022, incluindo ambos os sexos e todas as idades. Fonte: (WHO, 2022).

Embora a causa do câncer de pâncreas seja complexa e multifatorial alguns fatores de risco modificáveis e não modificáveis estão associados a maior incidência de ADP. Dentre os fatores de risco modificáveis estão: tabagismo, consumo de álcool, obesidade, fatores dietéticos e exposição a substâncias tóxicas. Os fatores de risco que não são modificáveis incluem sexo, idade, etnia, diabetes mellitus, história familiar de câncer, infecções crônicas, pancreatite crônica, grupo sanguíneo não -O e fatores genéticos (Rawla, Sunkara e Gaduputi, 2019).

O câncer de pâncreas normalmente inicia como uma lesão pré-cancerosa, conhecida como neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN), que acumula mutações genéticas ao longo do tempo, progredindo para um estado mais displásico (Park, Chawla e Reilly, 2022). Aproximadamente 90% dos cânceres de pâncreas de todos os graus apresentam mutações oncogênicas ativadoras do homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten (KRAS). Outros genes, incluindo a proteína tumoral p53 (TP53), o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) e o membro da família SMAD4 (SMAD4), também estão frequentemente envolvidos na carcinogênese e metástase do ADP (Wang *et al.*, 2021).

Atualmente, não existe um teste validado para detecção precoce do câncer de pâncreas, e em estágios iniciais o ADP geralmente é clinicamente silencioso. A maioria

dos pacientes que apresentam sintomas atribuíveis ao câncer de pâncreas apresentam doença avançada (Truong e Pauklin, 2021). Os sintomas, quando presentes, são inespecíficos para o trato gastrointestinal e incluem dor abdominal, icterícia, náusea, urina escura e perda de peso. Em decorrência da ausência nos estágios iniciais e inespecificidade dos sintomas o ADP é diagnosticado principalmente em estágio avançado e 80-90% dos pacientes apresentam tumores irresssecáveis no momento do diagnóstico (Kleeff *et al.*, 2016).

A ressecção cirúrgica primária é uma opção viável para 15-20% dos pacientes com ADP em estágio inicial, oferecendo uma chance de cura associada ao tratamento quimioterápico (Park, Chawla e Reilly, 2022). A gencitabina tem sido um medicamento terapêutico de primeira linha de referência para pacientes com câncer de pâncreas desde 1997 e a introdução da quimioterapia adjuvante teve impacto significativo no prognóstico após a ressecção. Diferentes regimes de quimioterapia adjuvante evoluíram ao longo do tempo, passando de monoterapia com 5-fluorouracil (5-FU) ou gencitabina para terapias combinadas, como gencitabina e capecitabina (GEMCAP) ou ácido folínico modificado, 5-FU, irinotecano e oxaliplatina (mFOLFIRINOX), contudo, apresentaram apenas uma sobrevida modesta com considerável toxicidade e efeitos adversos (Springfeld *et al.*, 2023). Embora a radioterapia possa melhorar o controle local em casos localmente avançados, seu uso é controverso, uma vez que muitos pacientes desenvolvem recorrência à distância (Hu e O'Reilly, 2024). Apesar do progresso considerável utilizando técnicas cirúrgicas avançadas e quimioterapia adjuvante, a sobrevivência a longo prazo (≥ 5 anos) permanece improvável para a maioria dos pacientes (Springfeld *et al.*, 2023).

O ADP possui uma carga mutacional intrinsecamente baixa, resultando em baixa expressão de neoantígenos, o que representa desafios significativos para a eficácia da imunoterapia. Esse cenário resulta em um microambiente tumoral pouco imunogênico, prejudicando as respostas eficazes das células T e, conseqüentemente, reduzindo a eficácia da imunoterapia. Além disso, o câncer de pâncreas apresenta outros mecanismos de resistência, como a expressão aberrante de pontos de controle imunológico, regulação negativa de moléculas apresentadoras de antígenos e obstáculos físicos, como o microambiente desmoplásico e a dificuldade na administração de medicamentos devido à sua natureza hipovasular (Looi *et al.*, 2019). Esses fatores compõem um desafio terapêutico complexo na abordagem do câncer pancreático.

1.3. Melatonina

A melatonina, também conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, foi inicialmente descoberta em 1958 como um hormônio extraído da glândula pineal de bovinos, recebendo seu nome devido à sua função específica em melanócitos de anfíbios e peixes, resultando no clareamento da pele desses animais (Lerner *et al.*, 1958). Posteriormente, essa molécula foi identificada em uma ampla variedade de organismos, revelando-se amplamente distribuída na natureza e presente em diversos compartimentos do organismo devido às suas características anfifílicas de difusão. A extensa distribuição da melatonina em diversos táxons indica que ela é uma molécula antiga que foi retida ao longo da evolução de todos os organismos mantendo sua estrutura conservada (Zhao *et al.*, 2019). Nos vertebrados, especialmente em mamíferos, a melatonina é produzida centralmente pela glândula pineal e liberada no sangue e no líquido cefalorraquidiano, desempenhando o papel de hormônio (Amaral e Cipolla-Neto, 2018).

A produção de melatonina pelos pinealócitos na glândula pineal é controlada pelo sistema neural localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, exercendo regulação da produção rítmica de melatonina em um padrão circadiano claro/escuro. Durante a noite, na ausência de luz, a noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos interage com os receptores beta e alfa noradrenérgicos na membrana dos pinealócitos, desencadeando a síntese de melatonina. Essa síntese é inibida na presença de estímulos luminosos (Hardeland, 2010).

A síntese da melatonina tem início com o aminoácido essencial triptofano, passando por quatro reações enzimáticas. Inicialmente, o triptofano é transformado em 5-hidroxitriptofano pela ação da triptofano-5-hidroxilase (TPH), que, por sua vez, é convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina) pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTR). A serotonina é então acetilada pela arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) para formar N-acetilserotonina (NAS), que, por fim, é convertida em N-acetil-5-metoxitriptamina, a melatonina, pela N-acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), anteriormente conhecida como hidroxí-indole-O-metiltransferase (HIOMT). Todas essas etapas enzimáticas estão sob o controle de sistemas neurais e endócrinos, os quais regulam o tempo, a duração e a quantidade de melatonina produzida (Tan *et al.*, 2014).

Devido à sua natureza anfifílica, a melatonina não é armazenada no interior dos pinealócitos, sendo liberada à medida que é sintetizada, atingido os maiores picos de concentração circulante durante a noite. No sangue, a melatonina geralmente está ligada à albumina, metabolizada em 6-hidroxi-melatonina pelas isoformas do citocromo P450

(principalmente CYP1A2) e conjugada a 6-sulfatoximetatonina no fígado, para posterior excreção urinária (Figura 3). A produção de 6-sulfatoximetatonina reflete perfeitamente os níveis plasmáticos de melatonina, portanto sua medição urinária é um método menos invasivo para avaliar a função pineal e a produção de melatonina. No sistema nervoso central, a melatonina é degradada em N-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e posteriormente é desformilada em N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (Claustrat e Leston, 2015).

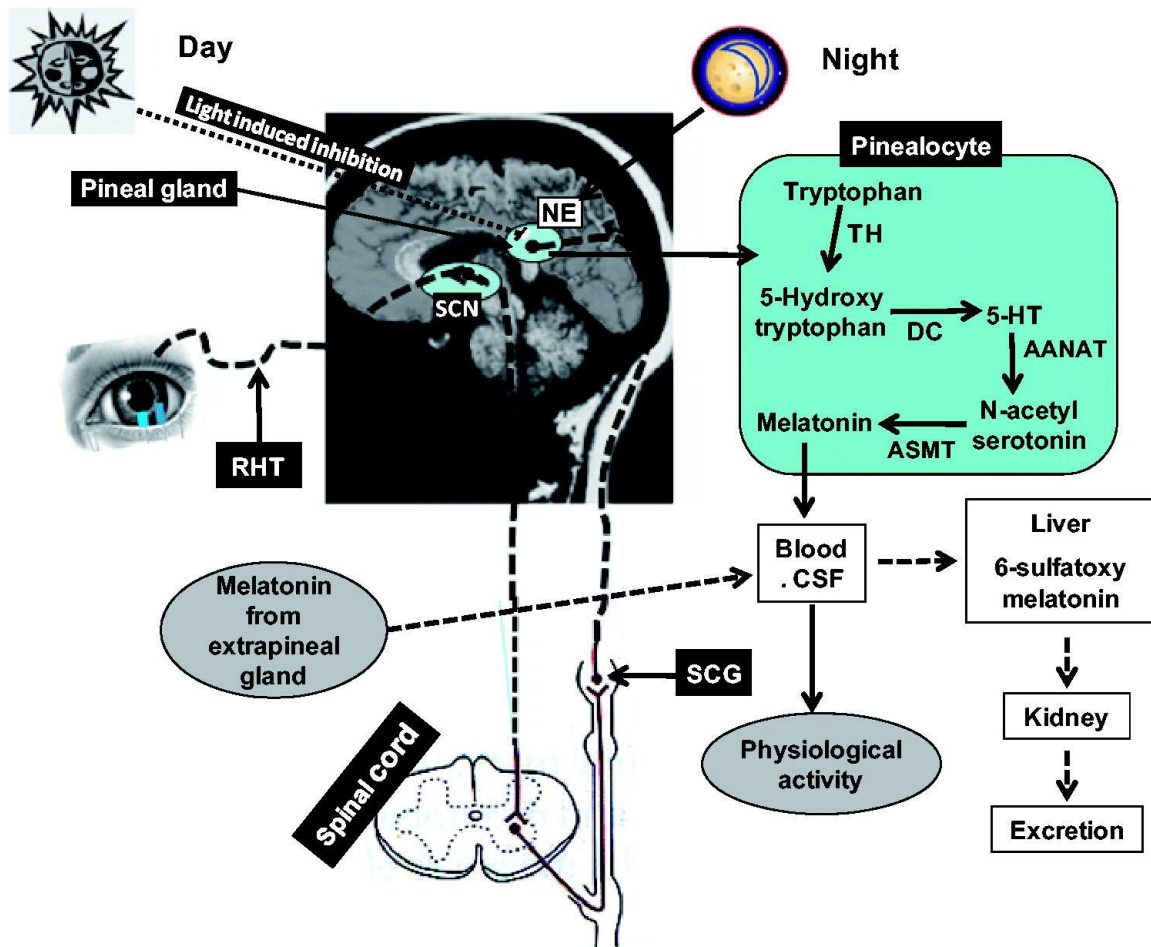


Figura 3 - Etapas da síntese de melatonina na glândula pineal. A melatonina é sintetizada na glândula pineal, na ausência de estímulos luminosos, a partir do triptofano em quatro etapas enzimáticas. Ao atingir a circulação sistêmica é metabolizada no fígado, a melatonina extrapineal também é metabolizada, e os metabolitos são excretados pela urina. Fonte: (Samanta, 2022)

A função inicial proposta da melatonina era desintoxicar os radicais livres gerados durante os processos de fotossíntese e metabolismo. Com a biodiversidade durante a evolução dos organismos, a melatonina tornou-se uma molécula pleiotrópica que resiste ao estresse relacionado à oxidação, mas também influencia os ritmos biológicos e desempenha efeitos anti-inflamatórios (Zhao *et al.*, 2019)

A melatonina é comumente reconhecida por seus efeitos na regulação dos ritmos circadianos, e a variação de 24 horas na síntese e liberação da melatonina pineal está associada à transmissão de informações circadianas por todo o organismo, como o ciclo vigília/sono e a reprodução sazonal (Reiter *et al.*, 2020). Além disso, estudos demonstraram que a melatonina e o sistema imunológico têm uma associação bidirecional: o sistema imunológico tem ações que promovem a biossíntese da melatonina e, inversamente, a melatonina modula a responsividade do sistema imunológico (Davoodvandi *et al.*, 2022). Curiosamente, a melatonina também tem potentes propriedades anti-inflamatórias através da redução dos níveis de expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) e pela regulação positiva da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-27 (Hardeland, 2019).

As propriedades biológicas da melatonina possuem um amplo espectro de mecanismos moleculares, incluindo ligação a receptores de membranas celulares, os receptores MT1 e MT2. Ambos os receptores são tipicamente acoplados a proteínas do tipo G i/o e o receptor MT1 está acoplado, adicionalmente, a proteínas do tipo G q. Em humanos, o gene MTNR1A que codifica MT1 está localizado no cromossomo 4q35.1 e o gene MTNR1B que codifica MT2 no cromossomo 11q21-q22 (Jockers *et al.*, 2016). A ativação desses receptores desencadeia efeitos específicos, como a redução dos níveis de cAMP e cGMP, interferindo em cascata na atividade de proteínas quinases. Além disso a melatonina interage também com receptores órfãos retinóides RZR/ROR, localizados no núcleo, da superfamília dos receptores esteroides. Outro local de ligação da melatonina é a enzima quinona redutase II, também conhecida como MT3. A presença dos receptores de melatonina é abrangente, ocorrendo em diversos tipos celulares, desde células imunológicas até tecidos como cérebro, retina, rim e pâncreas (Cecon, Oishi e Jockers, 2018).

Após a caracterização da síntese de melatonina na glândula pineal, a presença de enzimas relacionadas à melatonina, como AANAT e ASMT, foi posteriormente identificada em muitos outros tecidos e órgãos periféricos, desafiando sua classificação exclusiva como um hormônio. Estudos apontaram a síntese independente de melatonina em outros tecidos como a retina, timo e trato gastrointestinal, apresentando propriedades autócrinas e parácrinas (Claustrat e Leston, 2015).

Apesar da ausência de variações diurnas na síntese extrapineal de melatonina, alguns tecidos, como a retina, exibem picos noturnos. Além disso, muitos tecidos extrapineais têm concentrações mais altas de melatonina do que o plasma ao longo das 24

horas, e a melatonina intracelular desses tecidos geralmente não é liberada na circulação (Laborda-Illanes *et al.*, 2021). A produção local de melatonina sugere um papel protetor contra danos oxidativos e inflamatórios, considerando a eficácia da melatonina como antioxidante. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre principalmente durante as fases de atividade metabólica, motora e neural, essas atividades não ocorrem necessariamente à noite, por exemplo, em animais diurnos. Essa produção adaptativa em células não pineais destaca a melatonina como um mecanismo crucial para a sobrevivência celular e tecidual, desempenhando um papel essencial na proteção contra os efeitos nocivos dos metabólitos do metabolismo aeróbio (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014).

A melatonina é uma molécula que está sendo alvo para o tratamento de diversas doenças, devido as suas mais variadas funções, incluindo o câncer. Há evidências de que a melatonina apresenta efeitos antitumorais, como a inibição da viabilidade, proliferação, progressão e metástase das células neoplásicas ou mesmo um efeito protetor para o início do câncer (Chao *et al.*, 2019). Além disso, a melatonina pode regular as respostas epigenéticas e isto foi considerado útil quando combinado com vários medicamentos quimioterápicos, aumentando a sua eficácia com interações sinérgicas e também reduzindo os efeitos colaterais (Davoodvandi *et al.*, 2022). Isto chamou a atenção para o uso potencial da melatonina para o tratamento do câncer no ambiente clínico. Atualmente, a melatonina parece ser capaz de melhorar a evolução clínica de pacientes com câncer. Embora numerosos estudos tenham demonstrado a capacidade da melatonina de induzir a morte de células neoplásicas por apoptose, são essenciais mais estudos a fim de esclarecer seus mecanismos de ação (Favero *et al.*, 2018).

1.4. Morte celular

Em organismos multicelulares, tanto a divisão celular quanto a morte celular são essenciais para manter a homeostase normal dos tecidos. A morte celular desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase fisiológica a partir da eliminação de células danificadas e potencialmente prejudiciais, ao mesmo tempo que é também uma resposta patológica anormal a estímulos nocivos que pode levar à inflamação local ou sistêmica (Tong *et al.*, 2022).

O Comitê de Nomenclatura de Morte Celular descreveu mais de 10 tipos de morte celular, que são divididos em morte celular acidental ou regulada, de acordo com a morfologia, bioquímica e função. A morte celular acidental é um processo descontrolado, desencadeado por estímulos de lesão acidental de natureza física, química ou mecânica,

esses estímulos de lesão excedem a capacidade ajustável das células, resultando em morte celular. Já a morte celular regulada é caracterizada por vias de sinalização controladas e mecanismos efetores definidos que desempenham papéis importantes no desenvolvimento do organismo ou na renovação dos tecidos (Galluzzi *et al.*, 2018).

O tipo de morte celular regulada mais extensivamente estudada é a apoptose, que pode ou não induzir imunogenicidade em diferentes contextos (Medina *et al.*, 2020). As alterações morfológicas observadas durante a morte celular por apoptose incluem encolhimento celular e condensação da cromatina, externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática e notavelmente, a membrana plasmática permanece intacta. O citoplasma sofre alterações significativas, tornando-se mais sólido e formando numerosos corpos apoptóticos, que podem ser fagocitados e degradados por células vizinhas ou macrófagos (Galluzzi *et al.*, 2018).

Em geral, a apoptose se divide em vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca, também conhecida como via dependente da mitocôndria, é desencadeada por estressores intracelulares, como danos ao DNA ou estresse oxidativo, que resultam na permeabilização da membrana externa mitocondrial. Esse processo, regulado por proteínas da família BCL-2, leva à liberação de citocromo C. O citocromo C, ao se unir ao fator ativador da protease apoptótica 1 (APAF-1), forma o apoptossomo. Este complexo ativa a pró-caspase-9, que, por sua vez, cliva a pró-caspase-3 e a pró-caspase-7, efetuando a apoptose. A via extrínseca da apoptose é mediada por receptores de morte transmembrana, como TNFR, FASL e TRAIL. A ativação da pró-caspase-8 ocorre quando o receptor de morte se liga ao ligante correspondente, e a caspase-8 ativada cliva as pró-formas da caspase-3/7 para realizar a apoptose (Cai, Lv e Wang, 2023).

Anteriormente, acreditava-se que a apoptose era a principal forma de morte celular regulada, no entanto, as últimas duas décadas revelaram que uma série de modalidades de morte celular não apoptótica também são executadas de forma regulada e, em alguns casos, são programadas geneticamente. Estas vias estão envolvidas em processos celulares e teciduais distintos, mas compartilham algumas características semelhantes, além de apresentarem diferenças claras (Hadian e Stockwell, 2023). As características definidoras de cada via incluem o *status* mitocondrial, o nível de fragmentação do DNA e da cromatina, o envolvimento da ruptura da membrana e se o conteúdo celular é liberado. Além disso são reguladas por diversos sinais a montante, tais como citocinas e componentes bacterianos ou virais (Kopeina e Zhivotovsky, 2022).

Outros tipos de morte celular apresentam como principais características a lise celular e imunogenicidade. A princípio, acreditava-se que mortes líticas estariam associadas a um processo de morte acidental, biologicamente não controlada, sendo a morte necrótica a principal referência dessa classe. A necrose é morfológicamente caracterizada pelo inchaço de organelas e do citoplasma, 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 (Zhang *et al.*, 2018). Contudo, é bem descrito que a morte lítica também pode ser regulada. Algumas das modalidades reguladas de morte celular não apoptótica incluem necroptose, ferroptose, piroptose, parthanatos, NETose, morte celular autofágica, dentre outras (Galluzzi *et al.*, 2018).

Diferentes tipos de morte celular regulada podem induzir níveis variados de imunogenicidade. Por exemplo, a apoptose é geralmente imunologicamente silenciosa, devido à formação de corpos apoptóticos e à prevenção da liberação de conteúdo intracelular, enquanto a necroptose e a piroptose são processos pró-inflamatórios que liberam padrões moleculares associados a patógenos ou danos (PAMPs ou DAMPs) e alarminas (Peng *et al.*, 2022).

Os tumores utilizam múltiplas estratégias para evitar ou limitar as vias de morte celular, a pesquisa para o tratamento do câncer tem historicamente se concentrado na indução da morte celular apoptótica. Contudo, a resistência desenvolvida a essas terapias destaca a necessidade de explorar outras vias além da apoptose. A compreensão das vias de morte celular reguladas está impulsionando a identificação de potenciais alvos terapêuticos mais diversificados. Destaca-se que as vias de morte celular não apoptóticas possuem grande potencial no tratamento de doenças degenerativas, e terapias combinadas que visam múltiplas vias simultaneamente podem ser eficazes para superar mecanismos de resistência (Hadian e Stockwell, 2023).

1.5. Piroptose

A piroptose é um tipo de morte celular regulada de caráter lítico, mediada por proteínas membros da família gasdermina (GSDM) que depende, mas nem sempre, de caspases inflamatórias e está associada à liberação de fatores pró-inflamatórios (Galluzzi *et al.*, 2018). A piroptose foi primeiramente descrita em células imunes como macrófagos, monócitos e neutrófilos durante infecções microbianas (Cookson e Brennan, 2001).

Posteriormente, a morte piroptótica também foi observada em células cancerosas (Yu *et al.*, 2021).

As células submetidas à piroptose exibem características morfológicas que incluem inchaço e deformação celular, ruptura e lise da membrana plasmática, ruptura mitocondrial, dissolução do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, aparecimento de vacúolos e formação de corpos piroptóticos (Cai, Lv e Wang, 2023). A piroptose também contribui para a liberação de alarminas, como ATP, a proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) e a enzima lactato desidrogenase (LDH), resultando na amplificação da inflamação e no recrutamento de células imunológicas (Tan *et al.*, 2021).

As vias de sinalização responsáveis pela ativação da piroptose são distintas, incluindo a via canônica, dependente de Caspase-1, a via não canônica, envolvendo Caspase-4/5 em humanos e Caspase-11 em camundongos, e outras vias recentemente descobertas (Yu *et al.*, 2021). A via canônica requer a formação e ativação do inflamassoma, um complexo multiproteico que envolve receptores de reconhecimento padrões (PRRs), que incluem a família de receptores do tipo NOD (NLR) ou do receptor do tipo AIM (ALR). Os PRRs reconhecem PAMPs ou DAMPs que são específicos do inflamassoma correspondente, que por sua vez desencadeiam a transdução de sinal (Broz e Dixit, 2016). Cinco inflamassomas principais foram identificados, NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 e Pyrin, destes o NLRP3 é o mais amplamente estudado (Swanson, Deng e Ting, 2019).

Ao contrário de outros inflamassomas que são ativados por alguns estímulos altamente específicos ou apenas um, o inflamassoma NLRP3 pode responder a uma ampla variedade de estímulos que não estão relacionados estrutural e quimicamente, como patógenos, toxinas, metabólitos e ácidos nucleicos (Figura 4) (Lamkanfi, 2011). Na via canônica, a montagem do inflamassoma atrai a proteína adaptadora ASC, e ativa a pró-caspase-1. Esta caspase, por sua vez, é responsável pela maturação de pró-IL-18 e pró-IL-1 β e pela clivagem da GSDMD na porção N-terminal que sofrerá oligomerização e formará poros na membrana celular que permitirão o inchaço citoplasmático, induzindo a morte celular, bem como respostas inflamatórias pela liberação de fatores inflamatórios, como IL-18 e IL-1 β e DAMPs (Yu *et al.*, 2021).

Na via não canônica, as caspases-4/5 ou 11 são ativadas pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) citoplasmático. Funcionando de maneira análoga à caspase-1, elas clivam e ativam GSDMD, induzindo piroptose (Figura 4). A caspase-4 também pode ativar a caspase-1 na presença de NLRP3 e ASC (Shi *et al.*, 2014).

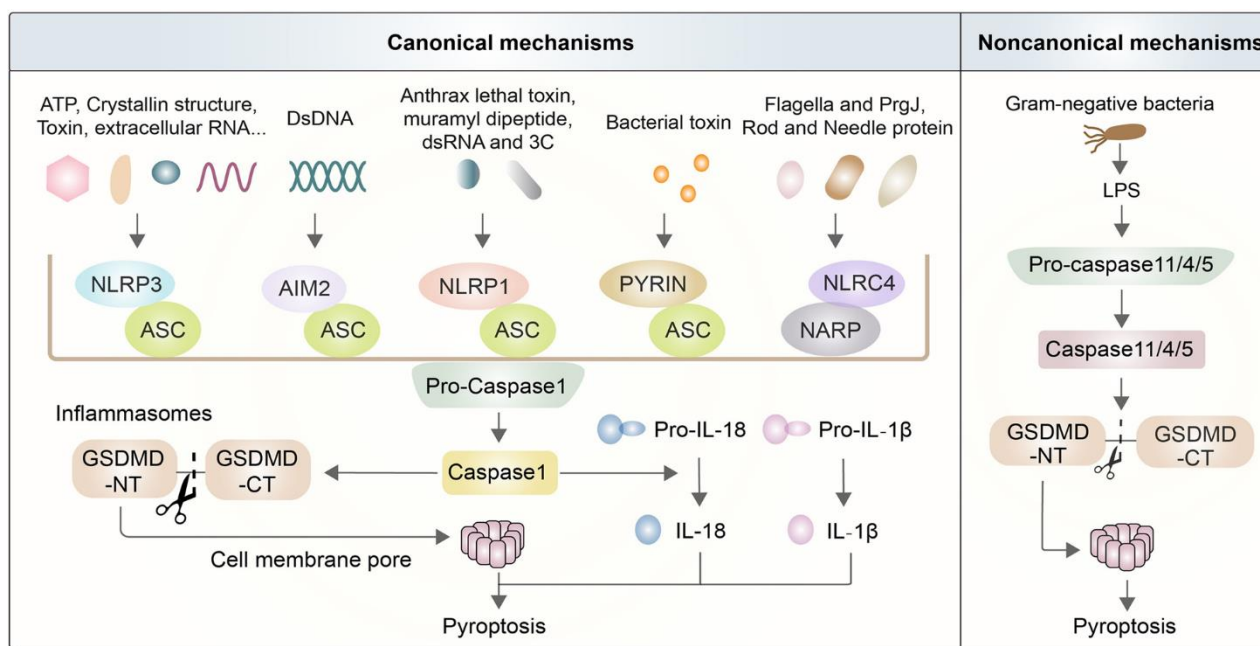


Figura 4 - Mecanismos da piroptose, via canônica e não canônica. Os mecanismos da piroptose são divididos em vias canônicas ativadas pela caspase-1 e vias não canônicas ativadas pela caspase-11/4/5. A caspase-1/11 ativada pode induzir a formação de GSDMD-NT, que leva a perfuração da membrana celular e morte celular. Fonte: (Wei *et al.*, 2022)

Na última década foram observados também diferentes mecanismos de piroptose, principalmente no contexto tumoral. Anteriormente, acreditava-se que caspases relacionadas à apoptose, como as caspases-3 e 8, eram incapazes de ativar a gasdermina e induzir piroptose. Contudo, foi demonstrado que drogas quimioterápicas poderiam induzir a clivagem de GSDME mediada por caspase-3, que causaram piroptose de células neoplásicas (Wang *et al.*, 2017). Além disso, foi descoberto que a inativação microbiana ou farmacológica da proteína TAK1 (quinase 1) pode induzir a clivagem de GSDMD relacionada à caspase-8 (Orning *et al.*, 2018). Curiosamente, outras gasderminas foram relacionadas a morte piroptótica como GSDMC e GSDMB bem como outras moléculas ativadoras como GzmA e GzmB, redefinindo a ideia de que a piroptose só pode ser ativada por caspases (Figura 5) (Kong e Zhang, 2023).

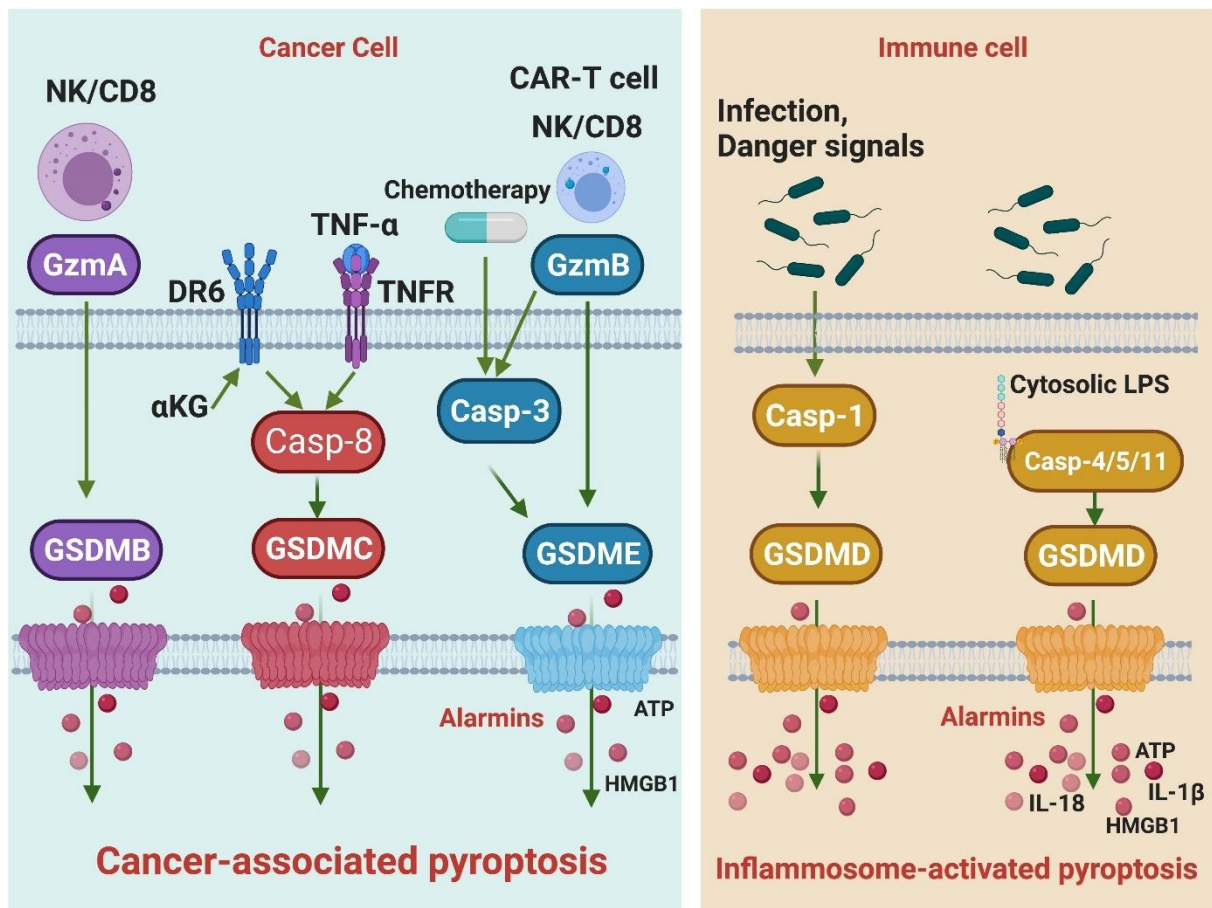


Figura 5 - Vias de sinalização da piroptose associada ao câncer. Outras GSDMs estão envolvidas na piroptose associada ao câncer, como GSDMB, GSDMC e GSDME e podem ser ativadas por diferentes estímulos como Granzimas, medicamentos quimioterápicos, TNF- α entre outras. Alarmins como ATP e HMGB1 são liberadas durante a piroptose associada ao câncer. Fonte: (Kong e Zhang, 2023)

Evidências emergentes demonstraram que a piroptose tem funções importantes na regulação da progressão tumoral. Por um lado, a inflamação recruta e ativa as células imunológicas, o que, em última análise, promove a eliminação do tumor. Por outro lado, a inflamação crônica pode aumentar o risco de carcinogênese. Nesse contexto, a piroptose desempenha um papel dual no contexto tumoral e obter conhecimentos mais profundos sobre o seu mecanismo representa um potencial no diagnóstico e tratamento do câncer (Lu *et al.*, 2022).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de pâncreas, especificamente o adenocarcinoma ductal pancreático, é um dos tipos mais letais de câncer do mundo (Sung *et al.*, 2021). Sua alta mortalidade é atribuída à dificuldade de detecção precoce, resultando em diagnóstico tardio, e à resistência aos tratamentos convencionais, como quimioterapia e radioterapia, especialmente em estágios avançados e com metástase. Devido a um microambiente tumoral imunossupressor, o câncer pancreático representa um desafio terapêutico significativo (Truong e Pauklin, 2021). Portanto, há uma necessidade crescente de identificar moléculas adjuvantes que, além de exercerem atividade antitumoral, possam também atenuar os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais.

A melatonina, é uma molécula pleiotrópica que apresenta diversas funções, desde o papel antioxidante e protetor celular ao efeito regulador dos ritmos circadianos (Zhao *et al.*, 2019). Também está sendo investigada como uma potencial molécula antitumoral por apresentar efeitos citostáticos e citotóxicos em alguns tipos de câncer (Davoodvandi *et al.*, 2022). Contudo, pouco se sabe sobre a ação da melatonina especificamente sobre parâmetros celulares e sobre a caracterização da morte lítica em células de câncer de pâncreas. Considerando os efeitos seletivos apresentados pela melatonina em células de câncer e que células de adenocarcinoma pancreático se beneficiam da imunossupressão, hipotetiza-se que a melatonina apresente um efeito antitumoral em células de adenocarcinoma pancreático bem como seja capaz de induzir a inflamação.

Considerando isso, o presente estudo visou caracterizar os efeitos da melatonina na modulação de parâmetros celulares e na morte por piroptose de células de adenocarcinoma pancreático humanas PANC-1 *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar o papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos e na morte piroptótica em células de adenocarcinoma pancreático humanas (PANC-1) *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

Caracterizar o papel da melatonina na modulação de parâmetros carcinogênicos de células de adenocarcinoma pancreático humanas PANC-1 *in vitro*, investigando:

- A viabilidade celular mitocondrial;
- O perfil de morte celular;
- A progressão do ciclo celular e fragmentação nuclear;
- A proliferação celular;
- A biogênese de corpúsculos lipídicos;

Caracterizar o papel da melatonina na indução da morte celular por piroptose em células de adenocarcinoma pancreático humanas PANC-1 *in vitro*, investigando:

- A formação de poros na membrana plasmática;
- A liberação de LDH;
- A ativação de Caspase-1;
- O perfil de secreção de citocinas;
- A acidificação lisossomal;
- A geração de espécies reativas de oxigênio;
- A formação de poros na membrana e o papel de ROS nesse processo;
- Alterações morfológicas das mitocôndrias.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo celular

A linhagem de células de adenocarcinoma ductal pancreático humana PANC-1 (“PANC-1 - CRL-1469 | ATCC”) foi cultivada em meio DMEM (meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco) (GIBCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantida em estufa úmida a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram tratadas com o kit BM Cyclin (Sigma) para garantir a ausência de contaminação por Mycoplasma e não foram realizadas mais de 6 passagens para realização dos experimentos.

4.2. Estímulo com melatonina

As células PANC-1 foram estimuladas com a melatonina a partir da adição da solução estoque de melatonina (Activa farmacêutica) reconstituída em etanol puro, na concentração de 500mM, em meio de cultura DMEM. A concentração estoque foi determinada a fim de se obter uma concentração final de veículo (etanol), 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, a solução foi adicionada em banho ultrassônico por 10 minutos em temperatura ambiente.

A partir da solução estoque de 500mM foram realizadas as respectivas diluições em meio de cultura a fim de se obter as concentrações finais de 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM e as células estimuladas foram mantidas em estufa a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO₂ pelos tempos de experimento analisados.

4.3. Análise da viabilidade celular mitocondrial

A análise da viabilidade celular mitocondrial das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir do ensaio com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) (Thermo Fisher). Este é um ensaio colorimétrico que baseia-se no fato de que o MTT quando reduzido por enzimas mitocondriais, apresenta-se com coloração roxeada na forma de cristais de formazan. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM de melatonina por 24, 48 e 72 horas, a fim de verificar se o veículo, etanol puro, utilizado para reconstituir a melatonina interferiria nos resultados obtidos, foram analisadas também

condições com as maiores concentrações de veículo utilizadas nos experimentos (5mM). Após o tempo de estímulo as células foram expostas à uma solução de MTT a 10% em meio de cultura sem SFB. As células foram incubadas em estufa a 37°C, protegidas da luz, numa atmosfera contendo 5% de CO₂ por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura da absorbância foi realizada em 570nm utilizando espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*). A análise dos dados realizada utilizando o software *GraphPad Prism*, considerando a média do valor de absorbância da condição não estimulada como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma proporcional. O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico DMSO.

4.4. Análise do perfil de morte celular

A análise do perfil de morte celular das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação das células pelos agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (quatroG Biotecnologia). Essa análise baseia-se no fato de que a Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolípídeos e possui alta afinidade pela fosfatidilserina, que são externalizadas em células apoptóticas, permitindo a ligação e emitindo fluorescência, ao passo que o PI é impermeável a membrana, o que impede a ligação ao material genético de células que matem a integridade da membrana. Nesse sentido, em vias de morte não-apoptóticas, onde ocorre dano a membrana plasmática, é possível observar a dupla marcação dos agentes fluorescentes. As células PANC-1 foram semeadas em placas de cultivo celular de 12 poços (n=3) com densidade celular de 1x10⁵ células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina por 72 horas. Após os tempos de estímulo, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1x em centrifugação à 1800 rpm, por 5 minutos a 4°C. As células foram então ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação 1x (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl₂), 2 µL de Anexina V-FITC e 2 µL de iodeto de propídeo e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1x, ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação 1x e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, *BD Biosciences*) utilizando os canais FITC e PE, ambos em escala exponencial. Como controle experimental foram utilizadas células aquecidas à 100 °C por 10 minutos. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *FlowJo V10 (Tree Star Inc)*.

4.5. Análise de progressão do ciclo celular e fragmentação nuclear

A análise da progressão do ciclo celular e da fragmentação nuclear das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação com Iodeto de propídeo (PI) (Sigma). O PI é uma sonda fluorescente intercalante de DNA e essa análise baseia-se no fato de que a quantidade de DNA é alterada nas diferentes fases do ciclo celular e a intensidade de fluorescência do PI é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior das células. As células PANC-1 foram semeadas em placas de cultivo celular de 12 poços (n=3) com densidade celular de 1×10^5 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM de melatonina por 48 horas. As células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas em etanol 70% gelado por 2 horas a 4 °C. As células foram então lavadas com PBS 1x em centrifugação à 1000G por 10 minutos e marcadas com a solução de Iodeto de propídeo (20 µg/mL de Iodeto de propídeo, 50 µg/mL de RNase, 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton) por 30 minutos, protegidas da luz, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x e centrifugadas à 1000G por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 400µL de PBS 1x e analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur, *BD Biosciences*) em canal FL-2 em escala linear. Os picos relativos às células em G0/G1 e G2/M e o platô associado à fase S foram obtidos e os valores de porcentagem foram analisados. Eventos que apresentaram fluorescência inferior à encontrada nas células em G0/G1 foram considerados casos de fragmentação nuclear. Os dados foram analisados utilizando os softwares FlowJo V10 (*Tree Star Inc*) e ModFit LT™.

4.6. Análise de proliferação celular

A análise de proliferação celular das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir do ensaio com CFSE. Esse composto permeável à membrana plasmática caracteriza-se por interagir com aminas biogênicas citoplasmáticas e emitir fluorescência. Uma vez que a célula realiza o processo de divisão celular, as moléculas de CFSE são igualmente divididas entre as células filhas, reduzindo assim a fluorescência presente em cada célula gerada, nesse sentido, a intensidade de fluorescência detectada é inversamente proporcional a taxa proliferativa das células.

As células PANC-1 foram semeadas em placas de cultivo celular de 12 poços (n=3) com densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células por poço. Anteriormente aos estímulos com melatonina, as células foram marcadas com a sonda CFSE (Thermo Fisher), na

concentração de 5 μ M em meio sem SFB e incubadas, protegidas da luz, por 15 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, foi realizada a etapa de bloqueio por 5 minutos com SFB puro, seguida de uma lavagem com PBS 1x. Os estímulos com melatonina foram realizados nas concentrações de 2.5mM e 5mM pelo período de 72 horas. As células foram então coletadas, lavadas com PBS 1x e centrifugadas à 1800 rpm, a 4°C por 5 minutos. Posteriormente foram fixadas em 400 μ L de paraformaldeído 1x. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, *BD Biosciences*) no canal FITC em escala exponencial e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Figura 6) (Tree Star Inc).

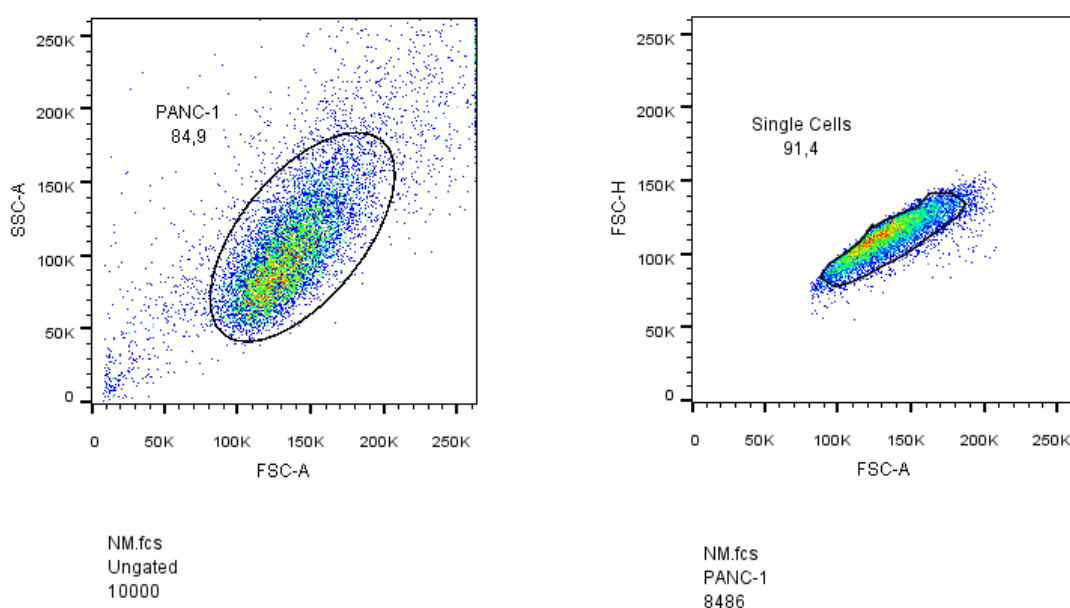


Figura 6 - Estratégia de *gate* em citometria de fluxo para células viáveis e *singlets* para análise de proliferação celular por CFSE.

4.7. Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos

A análise da biogênese de corpúsculos lipídicos das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação com a sonda fluorescente lipofílica BODIPY 493/503 (Life technologies) e com o corante lipofílico (Oil Red). Foram realizadas análises por espectrofotometria, microscopia de luz, citometria de fluxo e microscopia confocal de fluorescência a laser, respectivamente. Ambos os corantes apresentam a capacidade de se ligar a lipídios neutros, que se acumulam nessas organelas, desse modo é possível analisar de maneira quantitativa e qualitativa a biogênese de corpúsculos lipídicos.

Para análise por espectrofotometria, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após o tempo de estímulo as células foram lavadas com PBS 1x e foram expostas ao propilenoglicol (PEG) 4% por 15 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com a solução de Oil Red 0,5% em isopropanol por 30 minutos, na estufa a 37°C e após o período de incubação as células foram lavadas cinco vezes com água destilada. Após as lavagens, foram adicionados 100µL de isopropanol e as células foram incubadas em orbit shaker por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância da placa a 510nm em espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*).

Para análise por microscopia de luz, as células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm em uma densidade de 2×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após o estímulo, as células foram fixadas em solução de formalina 3,7% por 10 minutos na estufa a 37°C. Após a etapa de fixação as células foram lavadas com PBS 1x por três vezes sob agitação leve na gangorra. Em seguida as células foram expostas a 300µL de PEG puro por 2 minutos na estufa a 37°C. Posteriormente, o excesso de PEG foi retirado e as células foram incubadas em 300µL da solução de Oil Red 0,5% em PEG por 10 minutos a 37°C. Após a incubação as células foram lavadas em água destilada três vezes e coradas com hematoxilina 3% por 1 minuto. As células foram lavadas em água destilada novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem (*Agilent Technologies*) e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio de luz (*ZEISS*) e o software *Zen*.

Para análise por citometria de fluxo, as células PANC-1 foram semeadas em placas de 24 poços (n=3) em uma densidade de 5×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após tempo de estímulo, as células foram incubadas numa solução de BODIPY/PBS em uma proporção de 1:3000 a 4 °C ao abrigo de luz. Em seguida as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas em 400 µL de paraformaldeído 1x. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, *BD Biosciences*) utilizando o canal FITC em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (*Tree Star Inc*).

Para análise por microscopia confocal de fluorescência, as células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm em uma densidade de 2×10^4 células

por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 3, 6, 12 e 24 horas. Após o tempo de estímulo as células foram fixadas em formalina 3,7% diluída em meio aquecido, na estufa a 37°C, por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x sob agitação leve na gangorra por 5 minutos cada. Em seguida, as células foram incubadas em solução de BODIPY/PBS em uma proporção de 1:300 por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS 1x por três vezes e marcadas com uma solução de DAPI/PBS em uma proporção de 1:5000 por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS 1x novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem *anti-fading* (Agilent Technologies) e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5).

4.8. Análise de formação de poros na membrana plasmática

A análise de formação de poros na membrana plasmática das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação com Iodeto de propídeo (Sigma) no curso do tempo. Essa análise baseia-se no fato de que o PI é internalizado nas células após danos na membrana plasmática, e a emissão de fluorescência detectada é um indicativo de ligação a ácidos nucleicos devido a captação do PI por poros. As células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo transparente e paredes pretas em uma densidade de 1×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM de melatonina diluídas em DMEM sem vermelho de fenol, contendo 6µg/mL de PI e tampão HEPES, e imediatamente submetidas às leituras de fluorescência no espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*) por 8 horas em intervalos de 1 hora entre as leituras, ao abrigo da luz e em cabine a 37°C. A fluorescência foi analisada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 538nm e de 617nm de emissão. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

4.9. Análise da liberação de LDH

A análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular pelas células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da quantificação dessa enzima utilizando um kit comercial *Cytotoxicity Detection Kit* (ROCHE). Trata-se de um ensaio colorimétrico que consiste no potencial da enzima LDH

em converter o lactato em piruvato, reduzindo NAD⁺ a NADH. Em seguida, o NADH transfere o hidrogênio para o sal de tetrazólio, gerando formazan. A quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células mortas ou danificadas, indicando a liberação da LDH e a lise celular. As células foram semeadas em placas de 96 poços (n=3) em uma densidade de 1×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 0,625mM, 2,5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após o tempo de estímulo os sobrenadantes das células foram coletados e transferidos para uma nova placa, onde foi adicionado o coquetel de reação do *Cytotoxicity Detection Kit* (ROCHE) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o período de reação, foi adicionado uma solução de parada. Como controle do experimento foi utilizada uma solução de lise (Triton 0,5%). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 490nm, utilizando espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*). A análise dos dados foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism*.

4.10. Análise da ativação de Caspase-1

A análise da ativação de Caspase-1 nas células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir do ensaio com FAM-FLICA (*Immunochemistry Technologies*). Essa análise baseia-se no fato de que esse fluoróforo liga-se aos quatro resíduos de aminoácidos expostos pela caspase-1 quando ativa (YVAD) e emite fluorescência durante essa interação. As células PANC-1 foram semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 8 horas. Após o tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas com tampão de amostra e marcadas com a solução de trabalho contendo o fluoróforo por 30 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1800 rpm, por 5 minutos a 4°C e ressuspendidas em tampão. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, *BD Biosciences*) utilizando o canal FITC em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (*Tree Star Inc*).

4.11. Análise do perfil de secreção de citocinas

A análise do perfil de secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelas células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir do ensaio de ELISA, utilizando Kits comerciais (*BD Biosciences*). As células foram semeadas em placas de 96 poços (n=3) em uma densidade de 1×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas

com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após o tempo de estímulo os sobrenadantes das células foram coletados para dosagem das citocinas pelo método de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*) no comprimento de onda de 450nm. Os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

4.12. Análise da acidificação lisossomal

A análise da acidificação lisossomal das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação com Laranja de Acridina (*Sigma*). A laranja de acridina é uma base fraca lisossomotrópica que se acumula em compartimentos ácidos, trata-se de um corante metacromático que emite fluorescência em vermelho em lisossomos e em verde quando ocorre dano a membrana lisossomal. As células foram semeadas em placas de 24 poços (n=3) em uma densidade de 5×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após o tempo de estímulo as células foram coletadas e incubadas em solução de Laranja de acridina na concentração de 1µg/mL por 15 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, as células foram lavadas com PBS 1x em centrifugação, ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação 1x e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, *BD Biosciences*) utilizando os canais FITC e PE, ambos em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (*Tree Star Inc*).

4.13. Análise de geração de espécies reativas de oxigênio

A análise de geração de espécies reativas de oxigênio das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação com a sonda DCF-DA (*Sigma-Aldrich*), no curso do tempo e também a partir da marcação com CellROX Green (*Invitrogen*). Tanto o DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) quanto CellROX são sondas fluorogênicas para medir o estresse oxidativo, são permeáveis as células e não apresentam fluorescência quando no estado reduzido, mas emitem fluorescência fotoestável verde brilhante após oxidação por espécies reativas de oxigênio (ROS).

Para análise cinética da geração de espécies reativas, as células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo transparente e paredes pretas em uma densidade de 1×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram expostas ao DCF-DA na concentração

de 4 μ M por 45 minutos, em seguida as células foram lavadas com PBS 1x três vezes e estimuladas com as concentrações 2,5mM, e 5mM de melatonina diluídas em DMEM sem vermelho de fenol, contendo tampão HEPES, e imediatamente submetidas às leituras de fluorescência no espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*) por 6 horas com intervalos de 30 minutos entre as leituras, ao abrigo da luz e em cabine a 37°C. O peróxido de hidrogênio na concentração de 600 μ M foi utilizado como controle positivo do experimento. A fluorescência foi analisada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 485nm e de 535nm de emissão. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

Para análise pontual da geração de espécies reativas de oxigênio, as células foram semeadas em placas de 24 poços (n=3) em uma densidade de 5x10⁴ células por poço. No dia seguinte, as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 24 horas. Após tempo de estímulo, as células foram incubadas com a solução de CellROX em uma concentração de 5 μ M a 37°C na estufa, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida as células foram coletadas e lavadas três vezes com PBS 1x. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, *BD Biosciences*) utilizando o canal FITC em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (*Tree Star Inc*).

4.14. Análise de formação de poros na membrana plasmática na presença de NAC.

A análise de formação de poros na membrana plasmática das células PANC-1 na presença de NAC estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação com Iodeto de propídeo (Sigma) após o tratamento com N-acetilcisteína (Sigma) no curso do tempo. O NAC é um antioxidante e inibidor farmacológico de espécies reativas de oxigênio. As células foram semeadas em placas de 96 poços de fundo transparente e paredes pretas em uma densidade de 1x10⁴ células por poço. No dia seguinte as células foram expostas a solução de NAC em uma concentração de 10mM por 1 hora, em estufa a 37°C, e posteriormente estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina diluídas em DMEM sem vermelho de fenol, contendo 6 μ g/mL de PI e tampão HEPES. Após os estímulos as células foram imediatamente submetidas às leituras de fluorescência no espectrofotômetro (*Spectramax M3, Molecular Devices*) por 8 horas em intervalos de 1 hora entre as leituras, ao abrigo da luz e em cabine a 37°C. A fluorescência foi analisada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 538nm e de 617nm de emissão. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

4.15. Análise da abundância mitocondrial

A análise de mitocôndrias das células PANC-1 estimuladas com melatonina foi realizada a partir da marcação das células pela sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos (*Invitrogen*). Trata-se de uma sonda fluorescente que contém uma porção clorometil reativa ao tiol, que se difundem passivamente através da membrana plasmática e se acumulam nas mitocôndrias ativas. As células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm em uma densidade de 2×10^4 células por poço. No dia seguinte as células foram estimuladas com as concentrações 2.5mM e 5mM de melatonina por 3, 6, 12 e 24 horas. Após o tempo de estímulo as células foram incubadas com a solução de MitoTracker Red CMXRos diluída em meio completo em uma concentração de 100nM, em estufa a 37°C protegidas da luz, por 30 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura e fixadas em formalina 3,7% diluída em meio aquecido, na estufa a 37°C, por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x sob agitação leve na gangorra por 5 minutos cada. Em seguida, as células foram marcadas com uma solução de DAPI/PBS em uma proporção de 1:5000 por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS 1x novamente por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem *anti-fading* (*Agilent Technologies*) e as imagens foram adquiridas utilizando microscópio confocal de fluorescência a laser (*Leica TCS SP5*).

5. RESULTADOS

5.1. A melatonina reduziu a viabilidade celular mitocondrial das células PANC-1 de maneira dose e tempo-dependente

A fim de avaliar o efeito da melatonina sobre a viabilidade mitocondrial das células PANC-1 foi realizado o ensaio colorimétrico com MTT. Foram avaliadas as concentrações de 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM de melatonina após 24h, 48h e 72h de estímulo. Foi possível observar que após 24h de estímulo a melatonina reduziu significativamente a viabilidade mitocondrial das células PANC-1 *in vitro* a partir da concentração de 2,5mM em comparação com a condição não estimulada (Figura 7-A). Em tempos mais tardios de estímulo, como 48h e 72h esse efeito foi observado em todas as concentrações a partir da concentração de 1,25mM (Figura 7 – B e C) em comparação ao controle não estimulado, bem como é possível observar que houve uma intensificação na redução da viabilidade, evidenciando um maior efeito citotóxico dose e tempo-dependente. Nota-se que o veículo utilizado (Etanol <0,5%) não exerceu efeito sobre a viabilidade mitocondrial das células.

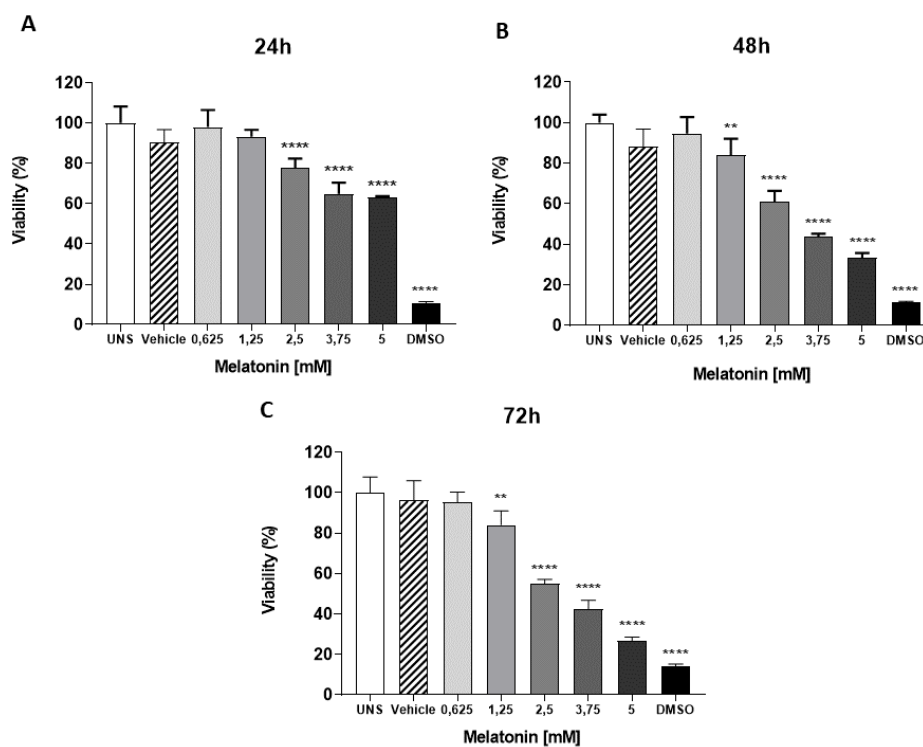


Figura 7- A melatonina reduziu a viabilidade celular mitocondrial das células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações: 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM, e 5mM por 24h (A); 48h(B) e 72h(C). Após os estímulos, o ensaio de viabilidade celular mitocondrial foi realizado utilizando MTT e a viabilidade celular foi calculada a partir das médias dos percentuais de células

viáveis em relação às células não estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % viáveis. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=5), sendo a diferença estatística significativa representada por (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.2. A melatonina induz morte lítica em células PANC-1

Sabendo que a melatonina apresentou um efeito citotóxico nas células PANC-1 objetivou-se investigar qual o perfil de morte celular estava sendo induzido pela melatonina. Para isso, as células PANC-1 foram estimuladas com as concentrações 0,625mM, 2,5mM e 5mM de melatonina e após 72h de estímulo foi realizada a dupla marcação com Anexina-V (FITC) e Iodeto de propídeo (PE). Foi possível observar que a o estímulo com a concentração de 2,5mM de melatonina aumentou aproximadamente 15% dos eventos positivos para Anexina-V e PI em comparação com a condição não estimulada (Figura 8 – C), evidenciando perda da integridade da membrana e um perfil de morte lítica das células PANC-1. Esse efeito foi intensificado na concentração de 5mM de melatonina (Figura 8-D), com um aumento de aproximadamente 60% das células positivas para a dupla marcação, corroborando com o efeito citotóxico dose-dependente da melatonina nas células PANC-1 observado em outras análises.

Quanto a porcentagem de células positivas somente para Anexina V, indicativo de morte por apoptose, a mesma permaneceu inalterada em todas as condições avaliadas (Figura 8- E). Evidenciando que o perfil de morte celular induzido pela melatonina nas células PANC-1 é majoritariamente morte lítica.

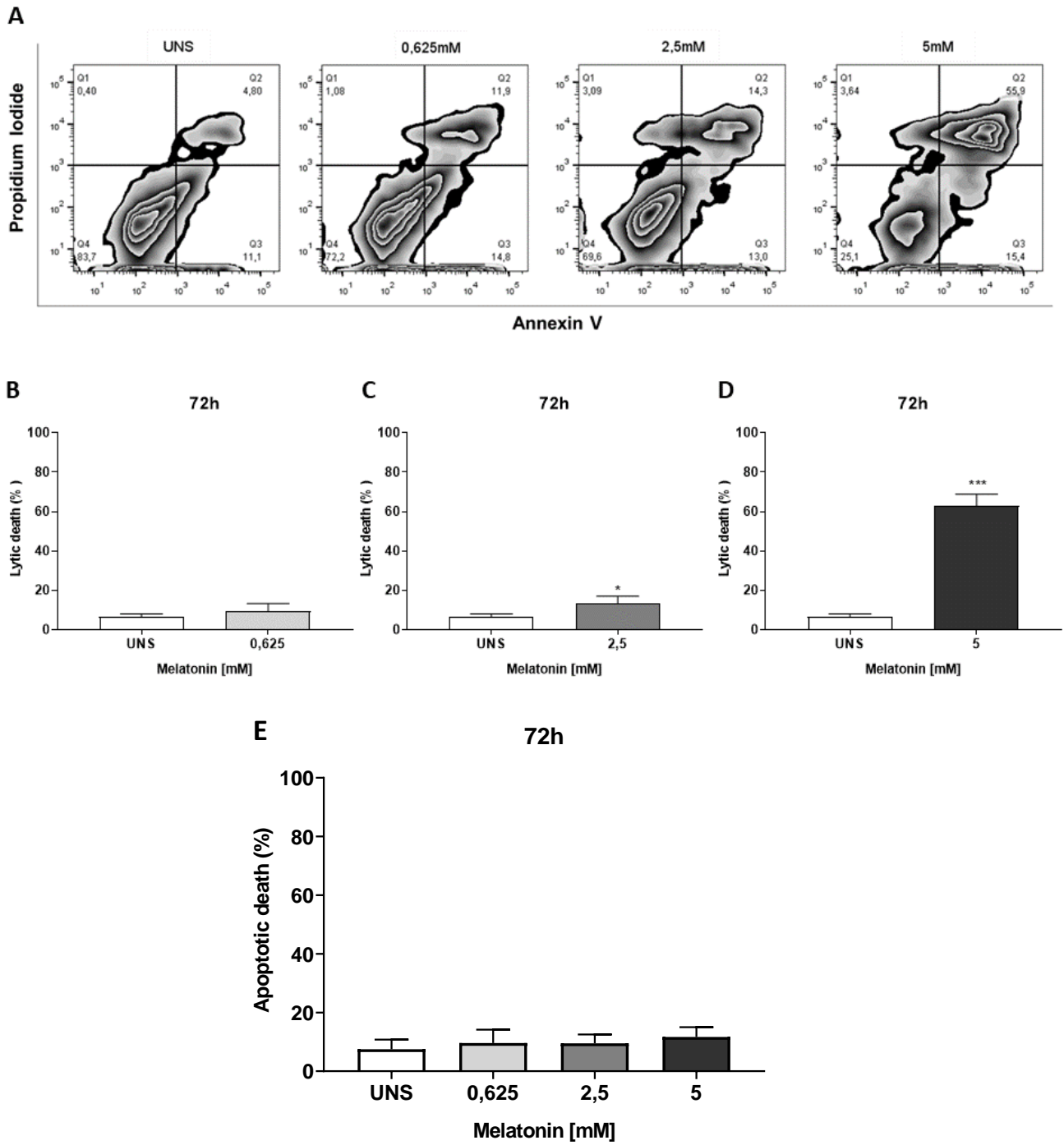


Figura 8 - A melatonina induz morte lítica em células PANC-1. Dotplot representativo das amostras analisadas (A). As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 0,625 mM, 2,5mM e 5mM por 72h. As células foram marcadas com marcador fluorescente Anexina-V (FITC) e Iodeto de propídeo (PE), e analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse). As porcentagens de células em morte lítica (B, C e D) e morte apoptótica (E) foi analisada com o software FlowJo. Os resultados estão expressos em forma de média das porcentagens \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicada por Teste T.

5.3. A melatonina aprisionou as células PANC-1 na fase G1 e reduziu as células em fase S do ciclo celular

Após a análise de proliferação celular, objetivou-se avaliar quais fases do ciclo celular das células PANC-1 poderiam estar sendo moduladas pelas diferentes concentrações de melatonina. A análise da progressão do ciclo celular foi realizada a partir da marcação com a sonda fluorescente intercalante de DNA iodeto de propídeo (PI) em células estimuladas com as concentrações 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM de melatonina após 48h. Foi possível observar que a melatonina na concentração de 1,25mM foi capaz de modular o ciclo celular promovendo a redução de aproximadamente 20% das células na fase S. E na concentração de 2,5mM foi possível observar o aprisionamento em cerca de 20% de células na fase G1 e a redução da porcentagem de células, em aproximadamente 25%, na fase S em comparação às células não estimuladas (Figura 9). Não foi possível analisar o efeito das concentrações de 3,75mM e 5mM devido a elevada citotoxicidade dessas concentrações, gerando dados não factíveis de análise.

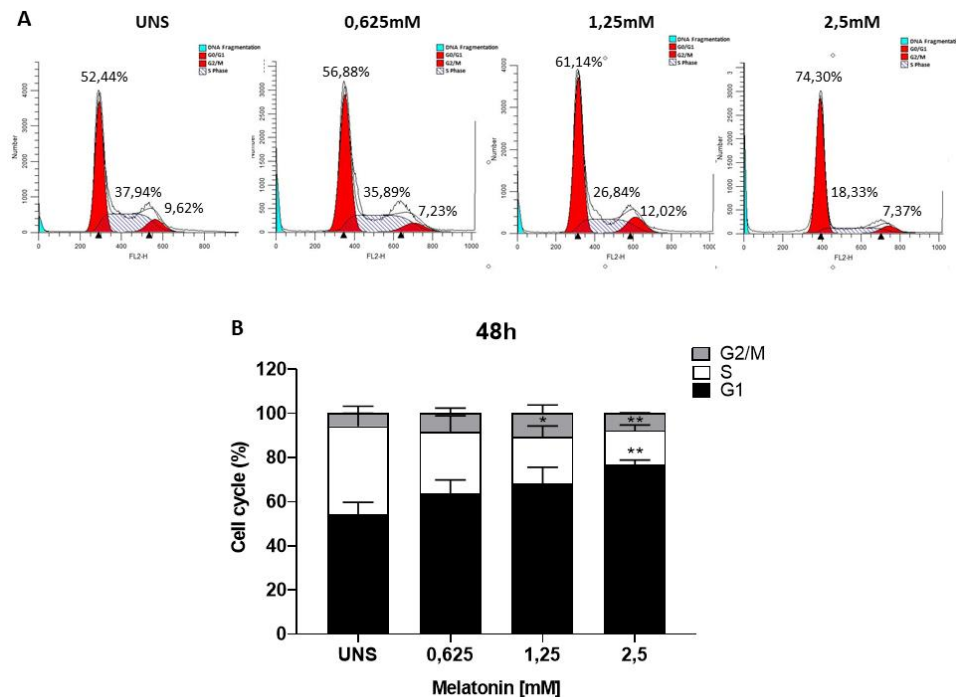


Figura 9 - A melatonina aprisionou as células PANC-1 na fase G1 e reduziu as células em fase S do ciclo celular. Gráficos representativos das amostras analisadas (A). As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM por 48h (B). As células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL-2:PE) e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur) em escala linear. A porcentagem de células por fase foi analisada pelo software ModFit LT™. Os resultados estão expressos em forma de média do percentual \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ em relação ao não estimulado (UNS) indicada por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.4. A melatonina induziu a fragmentação nuclear de maneira dose-dependente em células PANC-1

Na intenção de investigar se ocorre indução de fragmentação nuclear em células PANC-1 estimuladas com melatonina, foram consideradas as células do experimento anterior marcadas com iodeto de propídeo para citometria de fluxo, que apresentaram quantidade de DNA inferiores ao de uma célula em intérfase. Foi possível observar que as células não-estimuladas e estimuladas com a concentração de 0,625mM apresentaram valores inferiores a 5% de fragmentação nuclear, enquanto que as células estimuladas com as maiores concentrações: 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM apresentaram porcentagens significativas de fragmentação nuclear, evidenciando que a melatonina induziu a fragmentação nuclear de maneira dose-dependente em células PANC-1 (Figura 10).

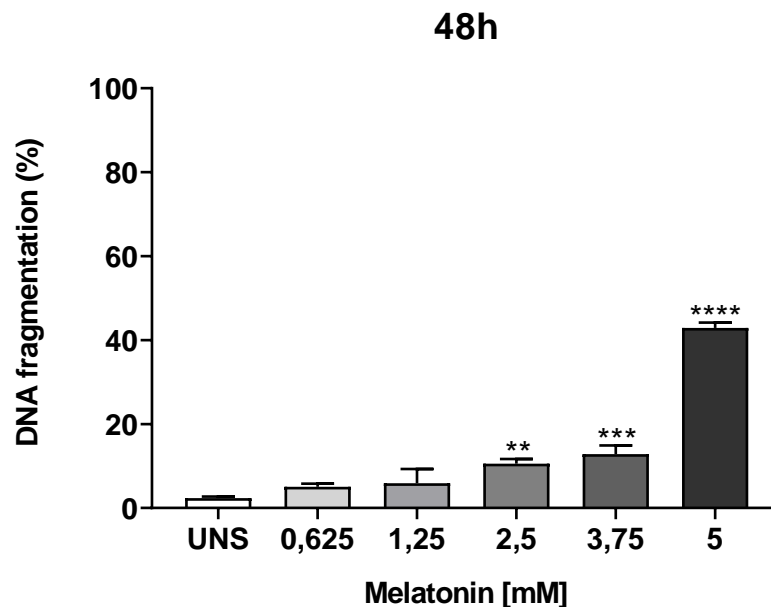


Figura 10-A melatonina induziu a fragmentação nuclear de maneira dose-dependente em células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM por 48h. As células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL-2:PE) e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur) em escala linear. Os resultados estão expressos em forma de média do percentual \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.5. A melatonina reduz a proliferação de células PANC-1

A fim de identificar se a melatonina modula a proliferação celular das células PANC-1, foi utilizada a sonda fluorescente permeável a membrana CFSE. A intensidade de fluorescência detectada neste ensaio é inversamente proporcional a taxa de proliferação celular, visto que o CFSE se liga a amins biogênicas no citoplasma e à medida que ocorre a divisão celular, a fluorescência também é dividida. Foi possível observar que após 72h de estímulo com a melatonina, a proliferação de células de câncer de pâncreas PANC-1 *in vitro* foi reduzida nas duas concentrações de melatonina analisadas: 2,5mM (Figura 11-B) e 5mM (Figura 11-C) em comparação com as células não estimuladas.

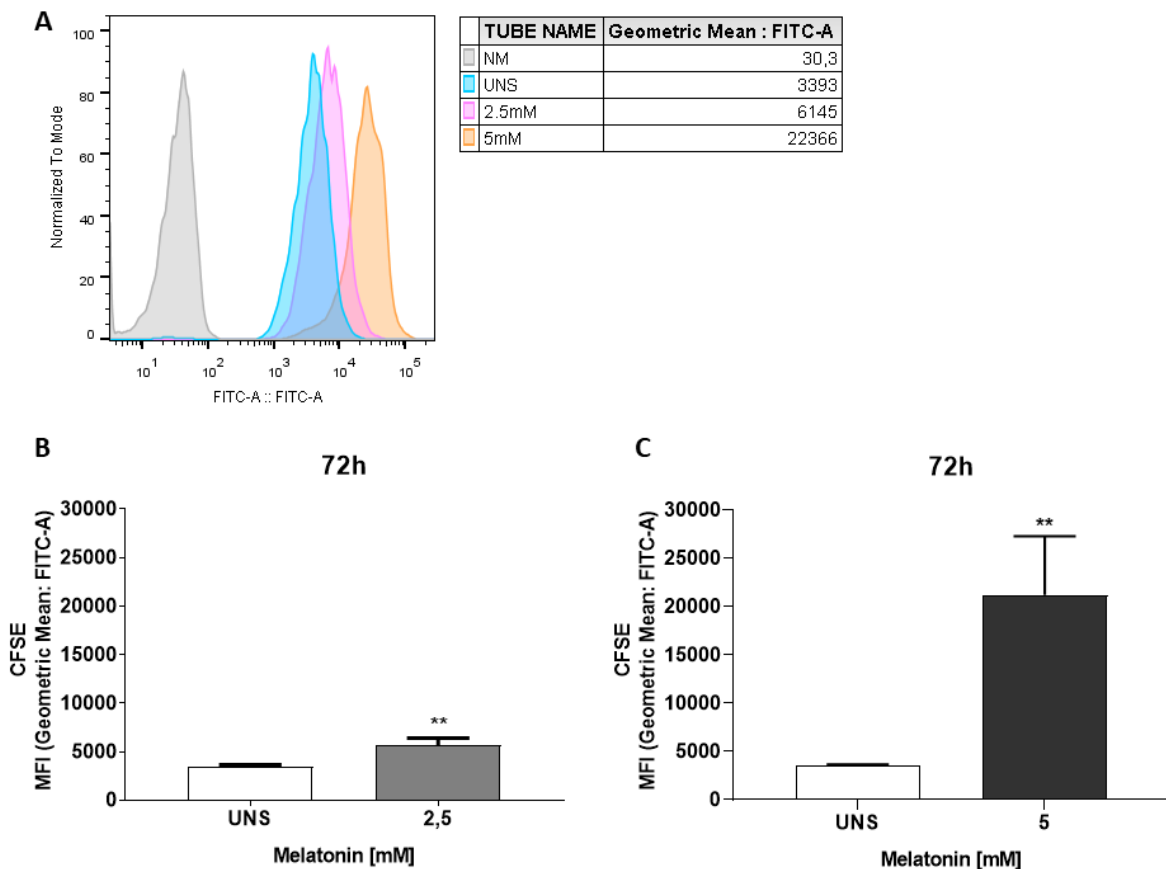


Figura 11-A melatonina reduz a proliferação de células PANC-1. Histograma representativo da intensidade de fluorescência das amostras (A). As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM (B) e 5mM (C) por 72h. As células foram marcadas com CFSE (FITC) anteriormente aos estímulos, e posteriormente analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse). Os resultados estão expressos em forma de média do MFI (Mean Fluorescence Intensity) (N=3) \pm desvio padrão, sendo a diferença estatística significativa representada por (**) $p < 0,01$ em relação ao não estimulado (UNS) indicada por Teste T.

5.6. A melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos em células PANC-1

A fim de avaliar a influência da melatonina no metabolismo lipídico das células PANC-1, a biogênese de corpúsculos lipídicos foi analisada por mais de uma técnica. Primeiramente as células PANC-1 estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM foram marcadas com o corante Oil Red. Ao analisar por espectrofotometria, foi possível observar que a melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dose-dependente (Figura 12), utilizando o mesmo corante, esse mesmo efeito foi observado por microscopia de luz nas células PANC-1 estimuladas com melatonina após 24h de estímulo (Figura 13). Segundamente, foi realizada a marcação das células PANC-1 estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM com a sonda lipofílica BODIPY. Ao analisar por citometria de fluxo a intensidade da fluorescência foi possível observar que após 24h de estímulo a melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dose-dependente (Figura 14), esse resultado foi corroborado pela visualização das células por microscopia confocal de fluorescência, marcadas com a mesma sonda, onde foi possível observar que a melatonina reduziu a quantidade de corpúsculos lipídicos a partir do tempo de 6h (Figura 15 – E e F) e esse efeito é intensificado após 24h de estímulo (Figura 15 – K e L). Todos os resultados evidenciam que a melatonina reduz a biogênese de corpúsculos lipídicos nas células PANC-1.

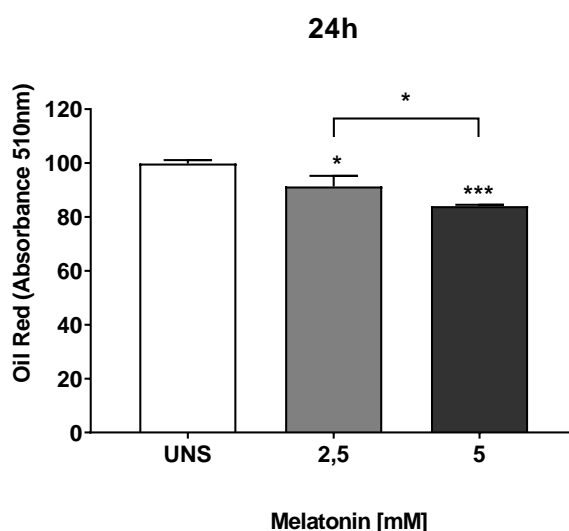


Figura 12- Redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, análise por espectrofotometria. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM. As células estimuladas foram marcadas com o corante Oil Red e analisadas por espectrofotometria (SpectraMax M3) após 24h de estímulo. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

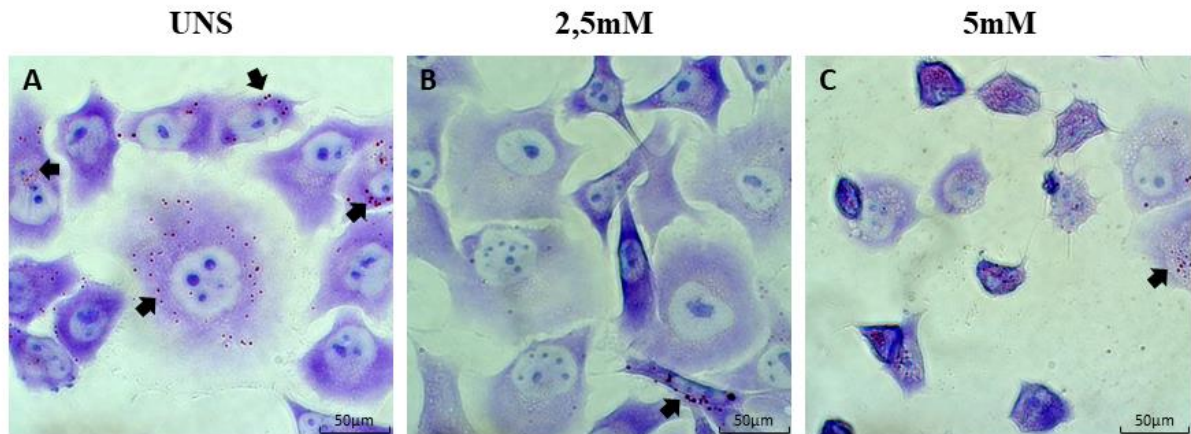


Figura 13- Redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, análise por microscopia de luz. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM (B) e 5mM (C). As células foram marcadas com o corante Oil Red e hematoxilina e analisadas por microscopia de Luz (*Zeiss AXIO LAB.A1*). Setas indicam corpúsculos lipídicos marcados com Oil red.

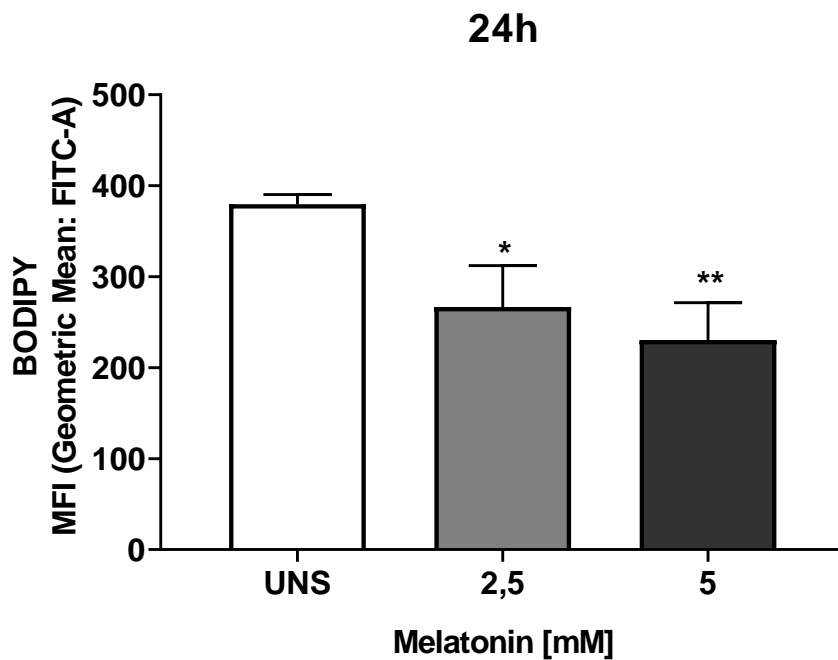


Figura 14 - Redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, análise por citometria de fluxo. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM e foram marcadas com Bodipy (FITC) após 24h de estímulo, analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse). Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

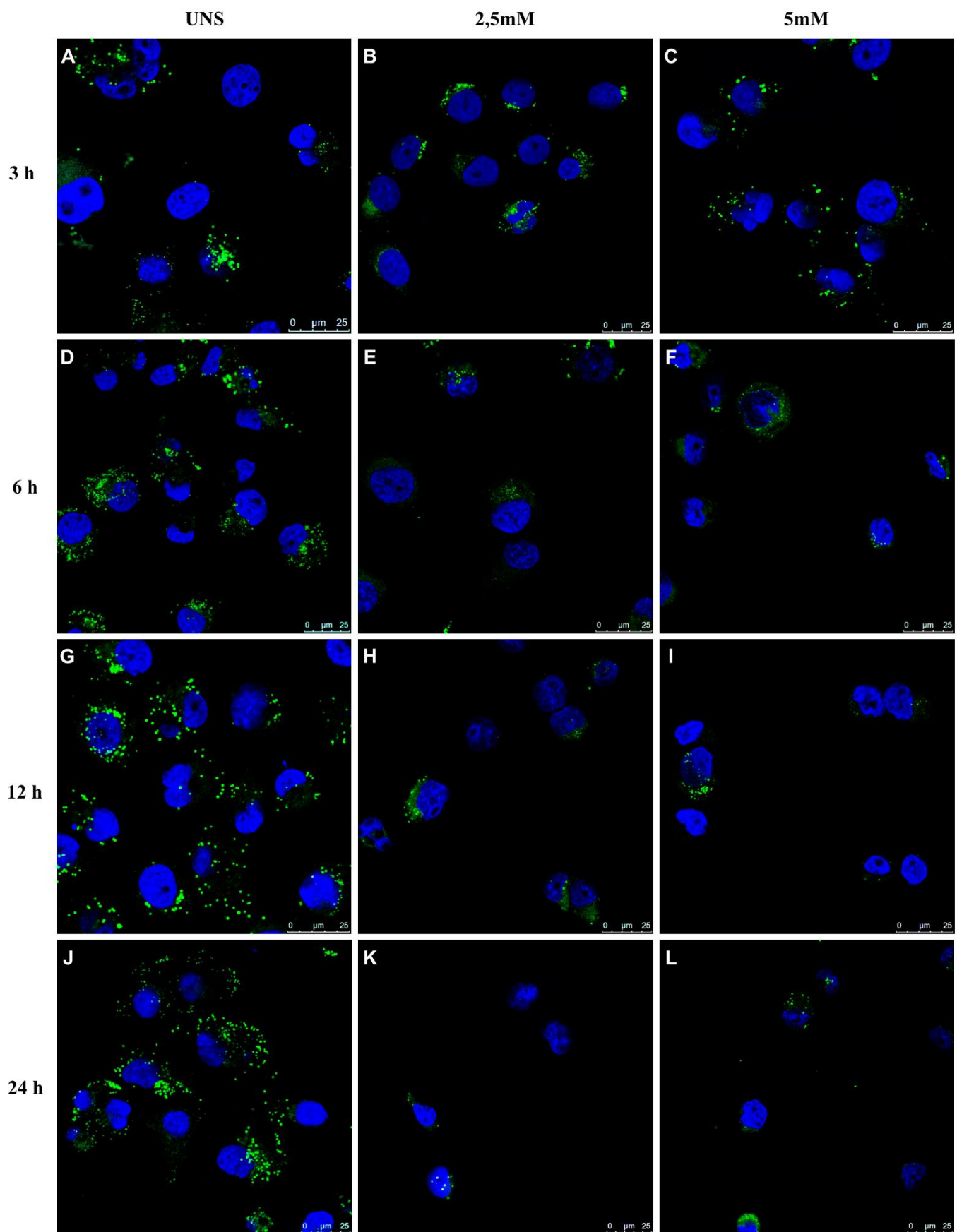


Figura 15 - A melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos em células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM. Após 3h (A-C), 6h (D-F), 12h (G-I) e 24h (J-L) de estímulo os corpúsculos lipídicos das células foram marcados com Bodipy (Verde) e o núcleo celular marcado com DAPI (Azul) e analisadas por microscopia confocal de fluorescência a laser (*Leica TCS SP5*).

5.7. A melatonina induz a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1 de maneira dose dependente.

A fim de comprovar a perda de integridade da membrana plasmática das células PANC-1 induzida pela melatonina, bem como investigar se esse efeito pode ser observado em tempos precoces, as células PANC-1 foram estimuladas com as concentrações 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM e 5mM de melatonina e marcadas com a sonda impermeável a membrana Iodeto de propídeo e analisadas em um ensaio cinético de fluorescência por 8 horas (Figura 16-A). Foi possível observar a captação de PI no curso do tempo pelas células PANC-1 estimuladas com melatonina nas maiores concentrações 3,75mM e 5mM a partir das primeiras 4 horas de estímulo, e em 8 horas esse efeito foi observado em todas as concentrações a partir de 1,25mM (Figura 16-B) evidenciando que a melatonina induz a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1 de maneira dose e tempo dependente.

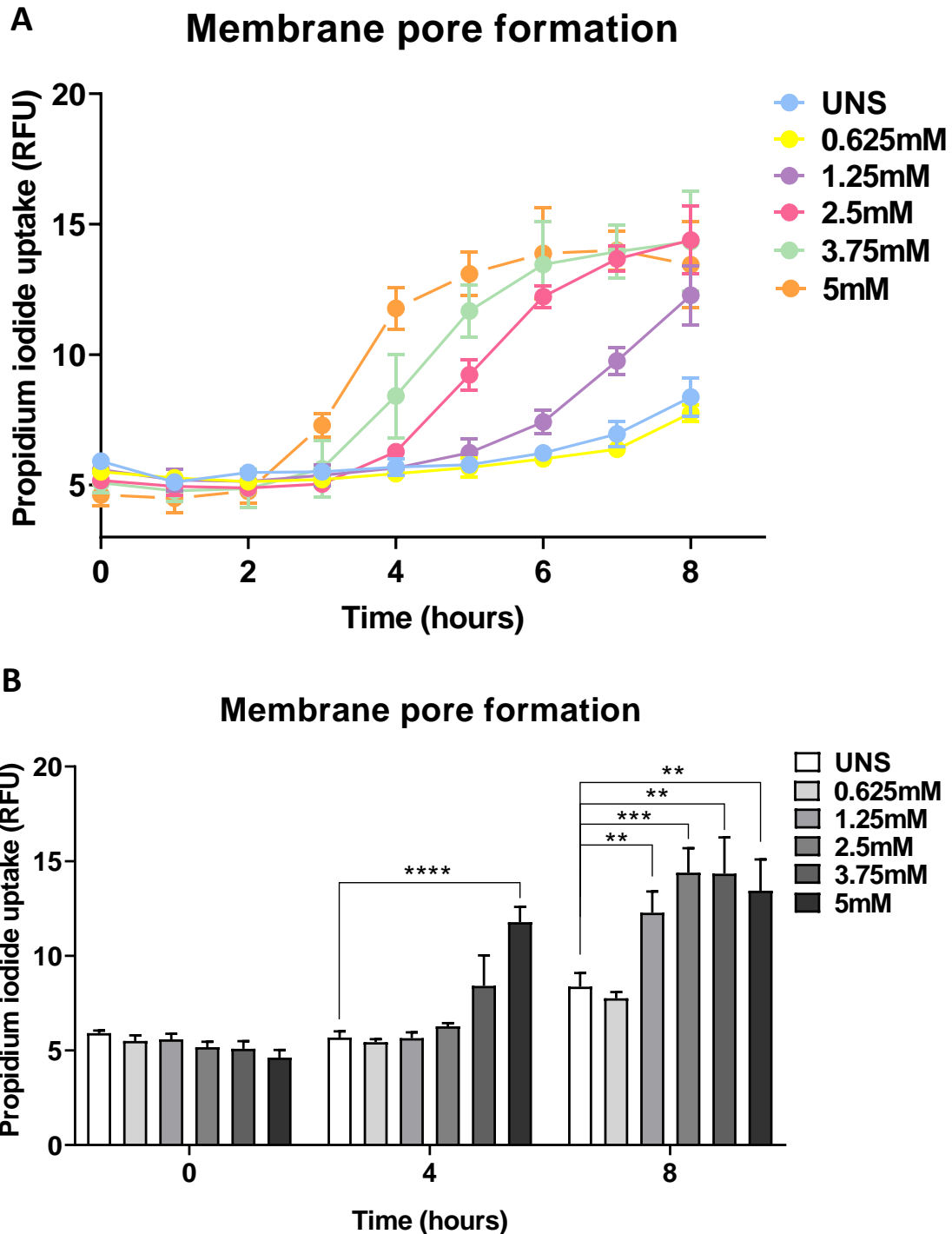


Figura 16 - A melatonina induz a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1 de maneira dose dependente. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações: 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 3,75mM, e 5mM e expostas a sonda impermeável à membrana plasmática Iodeto de propídeo durante 8 horas com leituras a cada 1h no espectrofotômetro (SpectraMax M3). Os resultados estão representados em gráficos linear (A) e de barras (B) e expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=5), sendo a diferença estatística significativa representada por (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por 2way ANOVA.

5.8. A melatonina induz a secreção da enzima LDH em células PANC-1

Como foi possível verificar que a melatonina induz morte lítica nas células PANC-1, observou-se o efeito da melatonina na secreção da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular das células PANC-1, para isso foi realizado o ensaio colorimétrico de dosagem de LDH (ROCHE Cytotoxicity Detection Kit) em células PANC-1 estimuladas com as concentrações 0,625mM, 2,5mM e 5mM de melatonina por 24h (Figura 17). Foi possível observar que as células PANC-1 estimuladas com 5mM de melatonina apresentaram um aumento significativo na liberação de LDH quando comparadas com a condição não estimulada, evidenciando que a melatonina na concentração de 5mM induz a secreção da enzima LDH em células PANC-1 após 24h de estímulo.

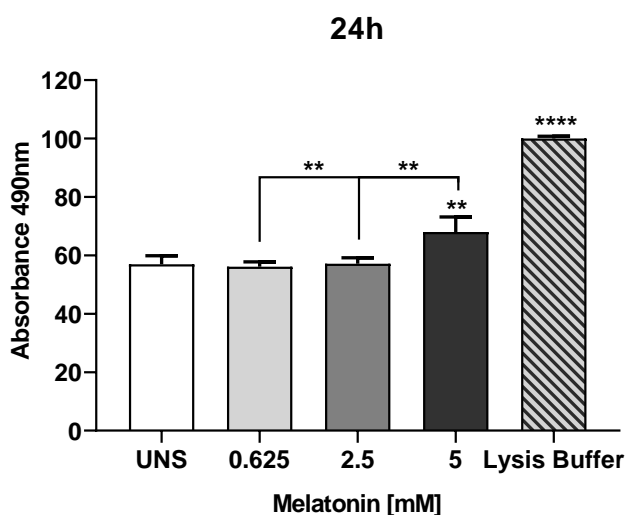


Figura 17 - A melatonina induz a secreção da enzima LDH em células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações 0,625mM, 2,5mM e 5mM por 24 horas. O sobrenadante das células foi analisado com o Kit ROCHE *Cytotoxicity Detection* conforme recomendações do fabricante por espectrofotometria (SpectraMax M3). Os resultados estão expressos em forma de média da absorvância \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$ indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.9. A melatonina induziu a ativação de Caspase-1 em células PANC-1

Considerando o papel central da caspase-1 na morte celular por piroptose, objetivou-se analisar se a melatonina induz a ativação da Caspase-1 em células PANC-1, para isso foi realizado um ensaio utilizando o agente fluorescente FAM-FLICA (FITC) após 8h de estímulo com as concentrações de 2,5mM e 5mM de melatonina (Figura 18). Foi possível observar que as células estimuladas com a concentração de 2,5mM de

melatonina apresentaram 60,5% das células positivas para caspase-1, e em comparação com a condição não estimulada a porcentagem de células com caspase-1 ativa aumentou 58,7% com esse estímulo. Contudo, esse efeito não foi observado na maior concentração (5mM), que apresentou uma redução de aproximadamente 27,2% da porcentagem de células com a caspase-1 ativa. Esses resultados indicam que a concentração de 2,5mM de melatonina induz a ativação de caspase-1 em células PANC-1 após 8h de estímulo.

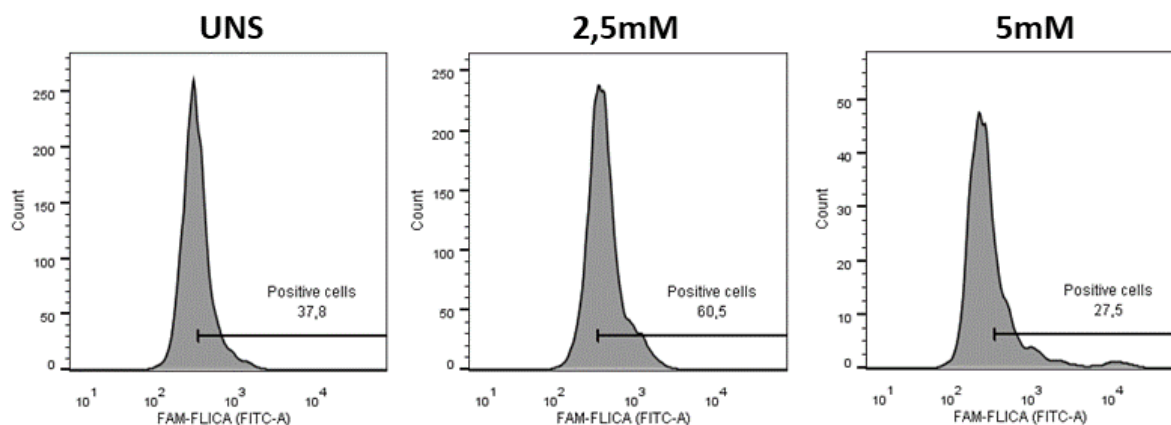


Figura 18 - A melatonina induziu a ativação de Caspase-1 em células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM por 8h. As células foram marcadas com marcador fluorescente FAM-FLICA (FITC) e analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse). As porcentagens de células positivas foram analisadas com o software FlowJo.

5.10.A melatonina não modulou a secreção de citocinas IL-1 β e IL-6, mas aumentou a secreção de TNF- α pelas células PANC-1 em 24h

Buscando identificar se a melatonina modula o perfil de secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, e TNF- α nas células PANC-1, foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA. As células PANC-1 foram estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina e após 24h de estímulo o sobrenadante foi coletado para dosagem das citocinas. Foi possível observar que a melatonina não alterou o perfil de secreção das citocinas IL-1 β e IL-6 nas células PANC-1 em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 19-A e B). Contudo, nas células PANC-1 estimuladas com a concentração 5mM de melatonina foi observado um aumento da secreção de TNF- α (Figura 19-C).

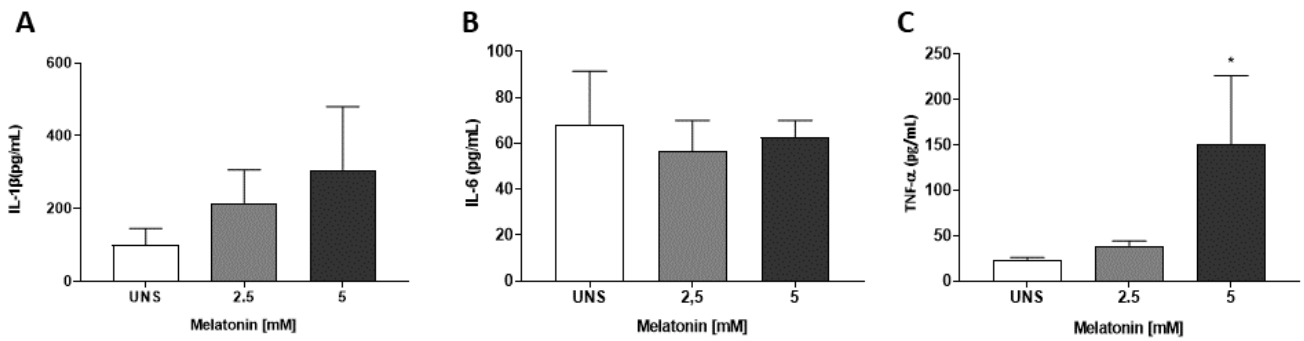


Figura 19 - A melatonina não modulou a secreção de citocinas IL-1 β e IL-6, mas aumentou a secreção de TNF- α pelas células PANC-1 em 24h. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações 2,5mM e 5mM por 24 horas. As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α presentes no sobrenadante foram dosadas pelo ensaio de ELISA. Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$ indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.11. A melatonina aumenta a acidificação lisossomal em células PANC-1

A fim de investigar o efeito da melatonina na acidificação lisossomal das células PANC-1, as células foram estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina por 24 horas e marcadas com sonda fluorescente Laranja de acridina. Ao analisar as células por citometria de fluxo foi possível observar que o estímulo com a melatonina aumentou a acidificação lisossomal nas células PANC-1 nas duas concentrações avaliadas (Figura 20) esses resultados sugerem que as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina aumentam a acidificação lisossomal em células PANC-1 em 24h de estímulo.

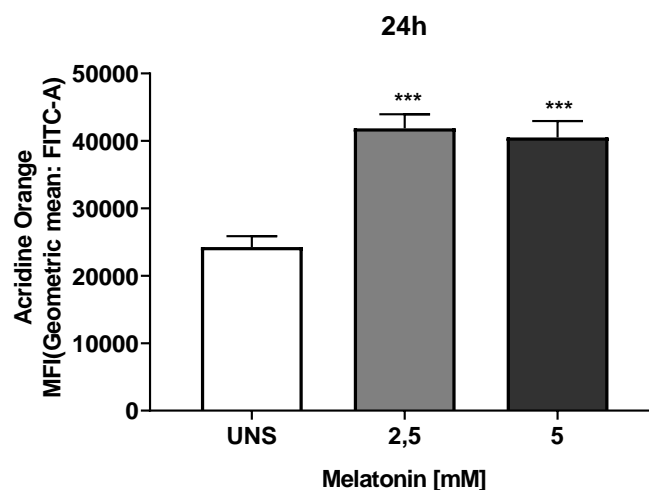


Figura 20 - A melatonina aumenta a acidificação lisossomal em células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM por 24h. As células foram marcadas com Laranja de acridina e analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse). Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (***) $p < 0,001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.12. A melatonina aumentou a geração de espécies reativas no curso do tempo, em 6h, de maneira dose dependente em células PANC-1

A fim de identificar se a melatonina induz a produção de espécies reativas, as células PANC-1 foram estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina e marcadas com a sonda permeável DCF-DA, analisadas em um ensaio cinético de fluorescência por 6 horas com leituras a cada 10 minutos (Figura 21-A). Foi possível observar que no curso do tempo, a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células PANC-1 estimuladas com melatonina apresentou um aumento da média de unidade de fluorescência relativa (RFU ~20), em concordância com o controle positivo utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (RFU~30) em comparação as células não estimuladas (RFU~10). Já nas primeiras 3 horas de estímulo é possível observar um aumento significativo da geração de espécies reativas de oxigênio nas células PANC-1 estimuladas com a concentração 5mM de melatonina, e após 6h de estímulo esse efeito também é observado na concentração de 2,5mM (Figura 21-B), evidenciando que o estímulo com melatonina nas células PANC-1 aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio em 6 horas de maneira dose e tempo-dependente.

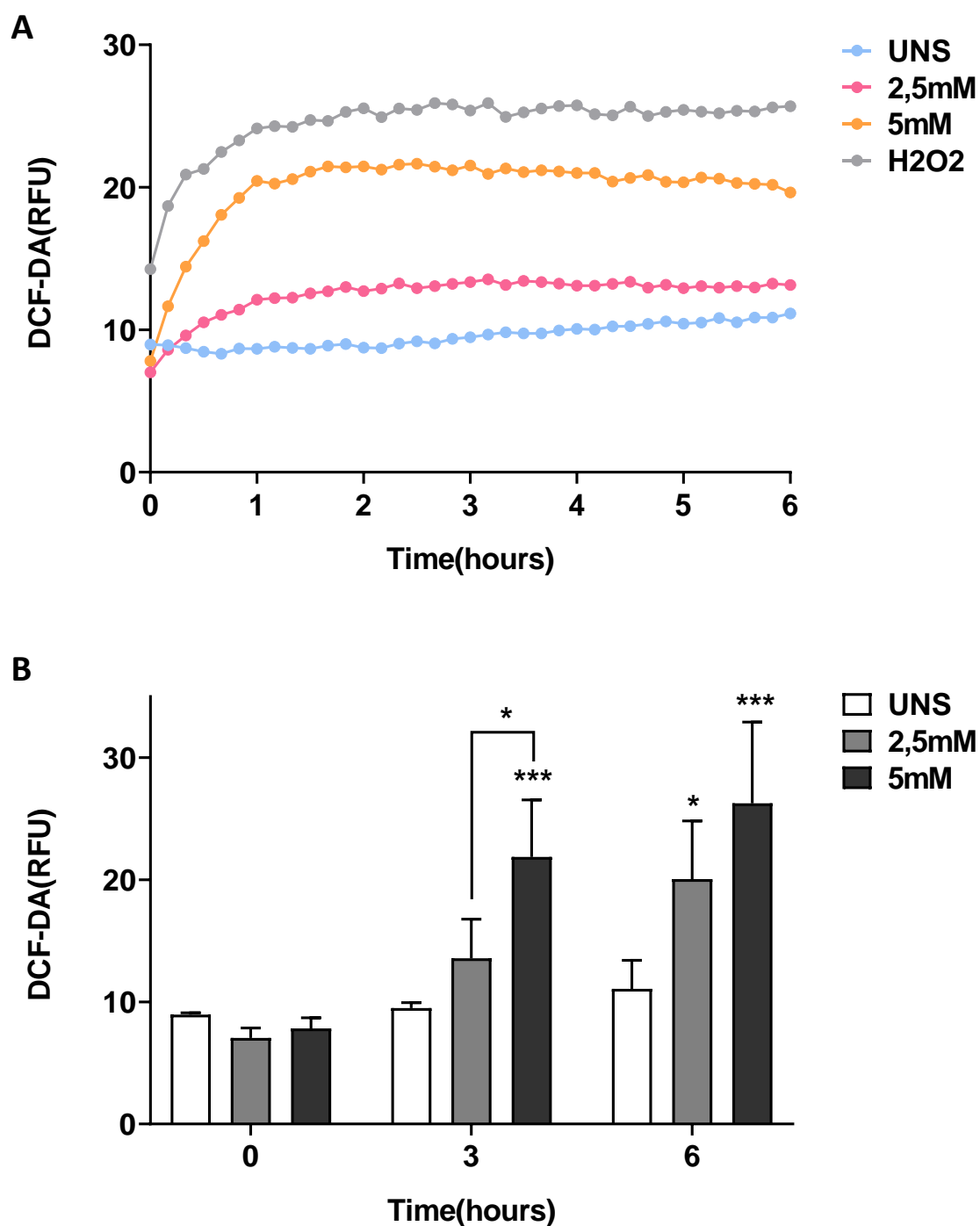


Figura 21 - A melatonina aumentou a geração de espécies reativas no curso do tempo, em 6h, de maneira dose dependente. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações 2,5mM e 5mM e expostas a sonda DCF-DA durante 6 horas com leituras de fluorescência a cada 10 minutos no espectrofotômetro (SpectraMax M3). Os resultados estão representados em gráficos linear (A) e de barras (B) e expressos em forma de média \pm desvio padrão ($n=5$), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ indicado por 2way ANOVA.

5.13.A inibição da geração de espécies reativas inibiu a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1

A fim de verificar se a geração de espécies reativas de oxigênio induzida pela melatonina em tempos precoces estaria associada a perda da integridade da membrana plasmática das células PANC-1, o mesmo ensaio cinético de fluorescência com a sonda impermeável iodeto de propídeo foi realizado em células PANC-1 estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina, por 8 horas com leituras a cada 1h, agora na presença do inibidor farmacológico N-Acetilcistina (NAC) que é um inibidor de espécies reativas de oxigênio. Foi possível observar que as células PANC-1 estimuladas com a concentração de 2,5mM de melatonina na presença de NAC mantiveram a integridade da membrana plasmática, observada pela ausência da captação de PI, da mesma maneira que a condição não estimulada (Figura 22-A e B). Contudo, nas células estimuladas com a concentração de 5mM de melatonina na presença de NAC, embora seja possível observar um atraso na formação de poros em comparação com as células estimuladas com a mesma concentração, mas sem a adição de NAC, bem como uma intensidade de captação do PI reduzida, a formação de poros na membrana plasmática das células PANC-1 não foi totalmente inibida (Figura 22-C e D). Esses resultados evidenciam uma relação da geração de espécies reativas de oxigênio induzida pela melatonina nas células PANC-1 com a perda da integridade da membrana plasmática nessas células, evidenciando o efeito inibidor da formação de poros na ausência de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo estímulo com a concentração de 2,5mM de melatonina, bem como atenuação desse efeito na maior concentração 5mM.

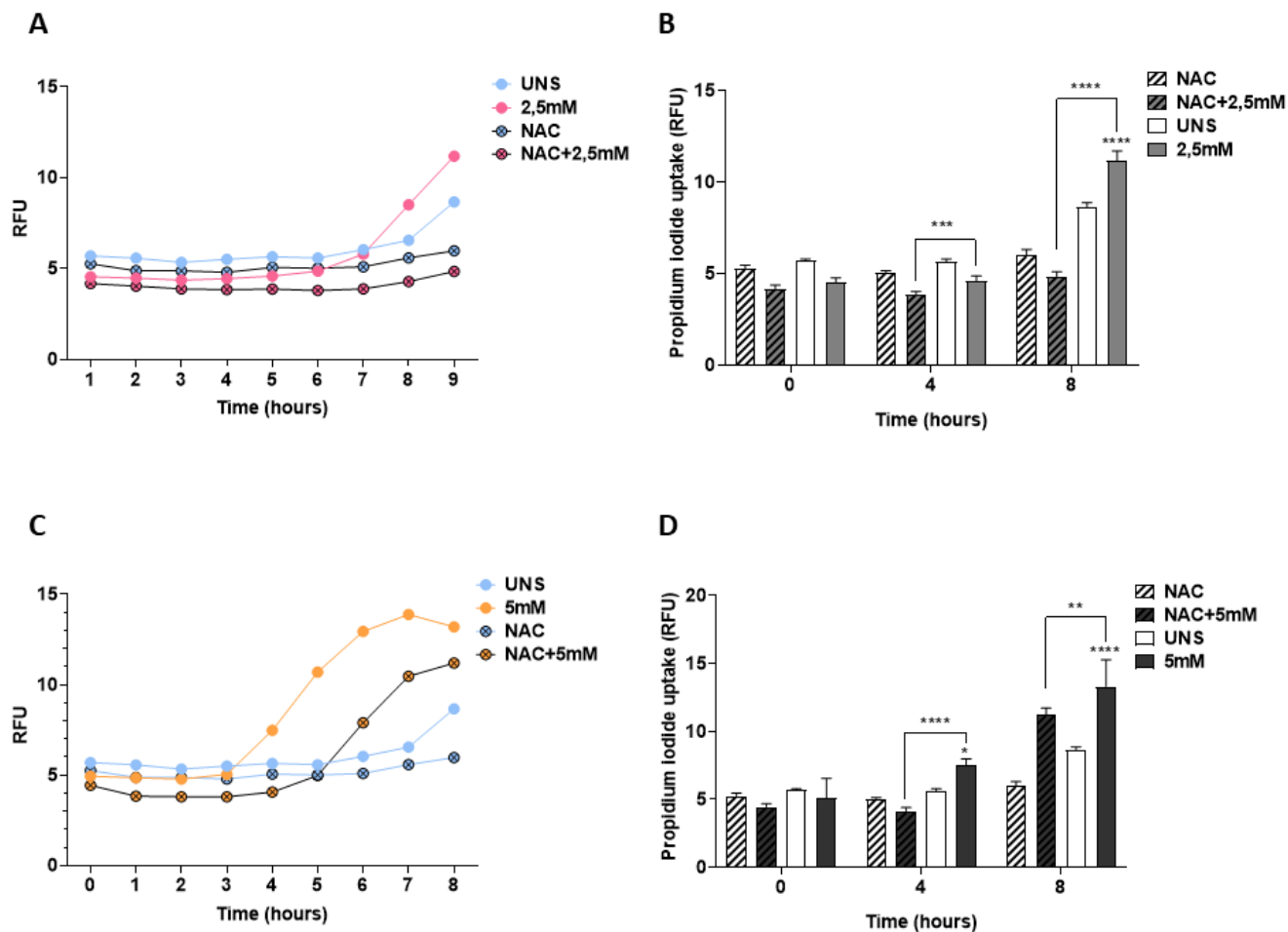


Figura 22 - A inibição da geração de espécies reativas inibiu a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações 2,5mM e 5mM na ausência e presença de N- acetilcisteína (NAC) e expostas a sonda impermeável à membrana plasmática Iodeto de propídeo durante 8 horas com leituras à cada 1h no espectrofotômetro (SpectraMax M3). Os resultados estão representados em gráficos linear (A e C) e de barras (B e D) e expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=5), sendo a diferença estatística significativa representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ indicado por 2way ANOVA.

5.14. A melatonina reduziu a geração de espécies reativas em células PANC-1 após 24h

Com o objetivo de verificar o efeito da melatonina na geração de espécies reativas de oxigênio também em tempos tardios, as células PANC-1 foram estimuladas com as concentrações 2,5mM e 5mM de melatonina por 24h e marcadas com a sonda fluorescente CellROX™ Green (FITC). Em contraponto ao ensaio anteriormente realizado para quantificar a geração de espécies reativas em células PANC-1 estimuladas com melatonina em tempos precoces, em que foi possível identificar a indução de ROS, após 24h de estímulo foi possível observar que a melatonina não modulou a geração de espécies reativas

de oxigênio em células PANC-1 estimuladas com a concentração de 2,5mM em comparação com as células não estimuladas. Já nas células estimuladas com a maior concentração de melatonina, 5mM, foi observada uma redução da geração de espécies reativas de aproximadamente 25% após 24h de estímulo em comparação a condição não estimulada (Figura 23).

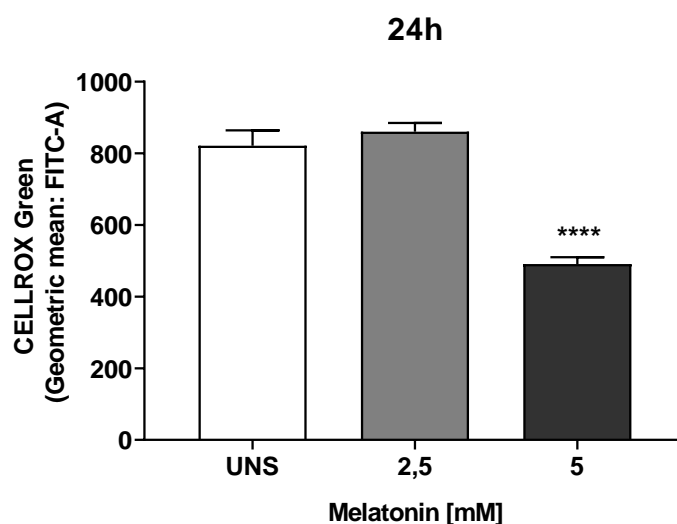


Figura 23 - A melatonina reduziu a geração de espécies reativas após 24h de estímulo. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM por 24h. As células foram marcadas com CellROX™ Green (FITC) e analisadas por citometria de fluxo (FACS Verse). Os resultados estão expressos em forma de média \pm desvio padrão (n=3), sendo a diferença estatística significativa representada por (****) $p < 0,0001$ em relação ao não estimulado (UNS) indicado por One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

5.15. A melatonina altera a abundância mitocondrial de células PANC-1

A fim de investigar se o aumento de ROS e a indução de morte celular nas células PANC-1 estimuladas com melatonina poderia estar relacionada com dano mitocondrial foi realizada a análise da morfologia mitocondrial por microscopia confocal de fluorescência das células. Foi realizada a marcação das células PANC-1 estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM com a sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos, enquanto o núcleo foi marcado com a sonda fluorescente DAPI, após 3h, 6h, 12h e 24h de estímulo. Foi possível observar uma diminuição ao longo do tempo da distribuição e conexão de mitocôndrias em células estimuladas com melatonina em ambas as concentrações de melatonina analisadas em comparação às células não estimuladas que apresentam um fenótipo mais alongado, distribuído ao longo do citoplasma celular e interconectado (Figura 24). Mais do que isso, observamos um maior acúmulo de mitocôndrias de células estimuladas na região perinuclear, demonstrando que a melatonina influencia na modulação da dinâmica mitocondrial.

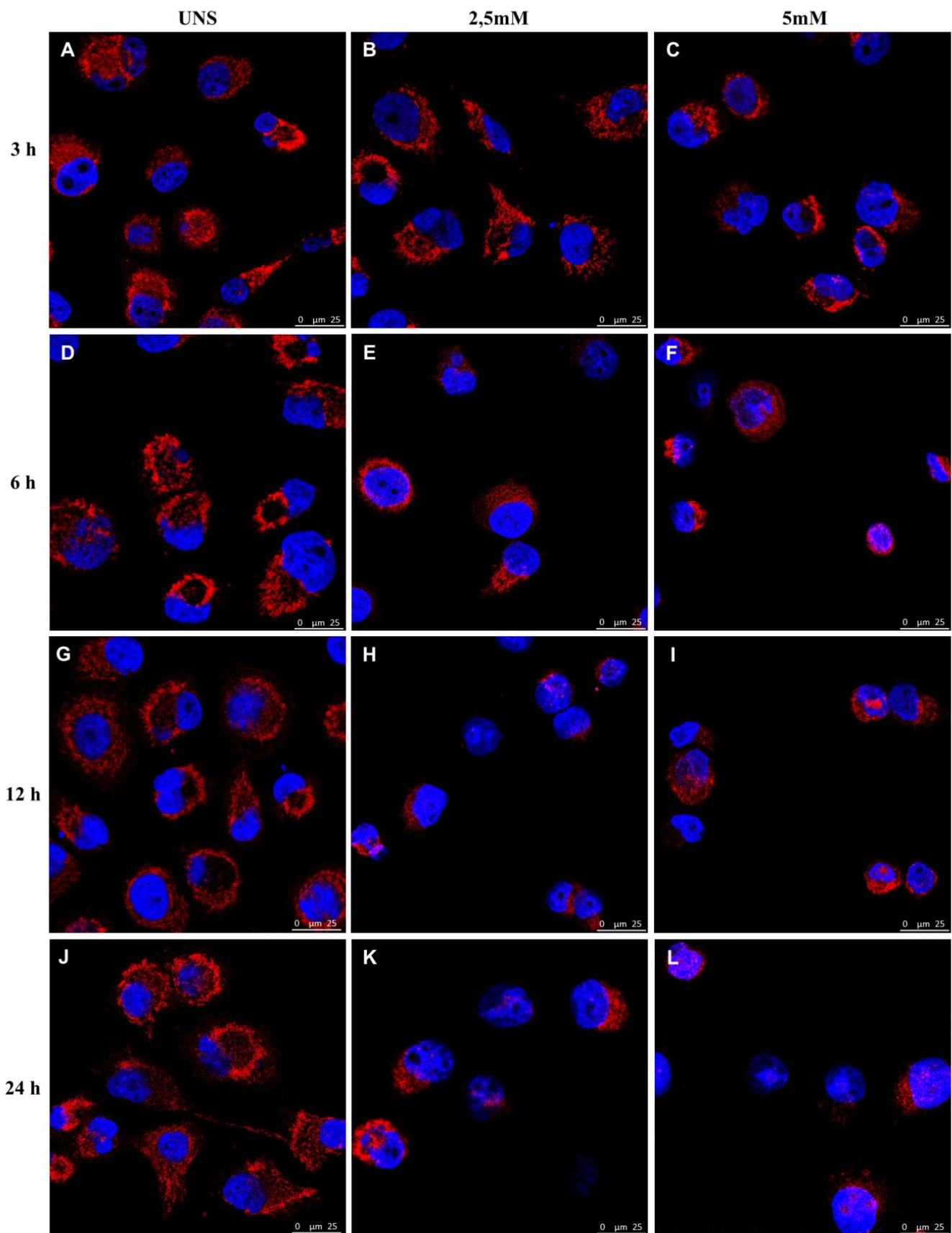


Figura 24 - A melatonina altera a abundância mitocondrial de células PANC-1. As células PANC-1 foram estimuladas com melatonina nas concentrações de 2,5mM e 5mM. Após 3h (A-C), 6h (D-F), 12h (G-I) e 24h (J-L) de estímulo as mitocôndrias das células foram marcadas com MitoTracker Red CMXRos (Vermelho) e o núcleo celular marcado com DAPI (Azul) e analisadas por microscopia confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos o efeito da melatonina sobre células de adenocarcinoma pancreático humanas PANC-1, analisando parâmetros celulares e investigando a morte celular induzida por essa molécula.

O Adenocarcinoma ductal pancreático apresenta um desafio significativo no diagnóstico e tratamento devido ao seu microambiente tumoral complexo. Um componente chave desse microambiente é a presença de células estreladas pancreáticas (PSCs), que em condições fisiológicas têm uma função reguladora na arquitetura do tecido pancreático, mas quando ativadas em condições patológicas e/ou em condições de hipóxia, como no câncer, contribuem para o desenvolvimento de fibrose (Pothula *et al.*, 2020). A fibrose resultante cria um microambiente favorável para o crescimento das células cancerosas, tornando-as mais resistentes à quimioterapia e radiação, e promovendo o crescimento, invasão e metástase (Truong e Pauklin, 2021). A eficácia limitada desses tratamentos, juntamente com seus potenciais efeitos colaterais, tem motivado a pesquisa por novas terapias antitumorais que se baseiem em suplementos e compostos naturais, tanto como abordagens isoladas quanto em combinação (Block *et al.*, 2015; Mehrzadi *et al.*, 2021).

Foi demonstrado que a melatonina apresenta efeitos preventivos na incidência do câncer, protegendo as células normais contra o desenvolvimento de doenças malignas em diferentes níveis (Samanta, 2022). A melatonina neutraliza os radicais livres direta ou indiretamente e o efeito anti-inflamatório da melatonina pode prevenir o desenvolvimento de estresse oxidativo crônico (Reiter *et al.*, 2016), também foi descrito que a melatonina é capaz de aumentar as enzimas de reparo ao DNA para prevenir mutações e instabilidade genômica (Sliwinski *et al.*, 2007).

A melatonina está emergindo como uma potencial ferramenta terapêutica para o ADP, pois demonstrou a capacidade de sensibilizar seletivamente as células cancerosas às terapias citotóxicas (Favero *et al.*, 2018), ao mesmo tempo que protege as células normais da toxicidade de tais agentes, aliviando os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia (Haghi-Aminjan *et al.*, 2018; Najafi *et al.*, 2017). Além disso, estudos descreveram que a melatonina pode modular a atividade das PSCs e pode atuar como um agente antifibrótico, suprimindo a proliferação celular e reduzindo a expressão de marcadores de ativação, especialmente em condições de hipóxia, retornando as PSCs ao estado quiescente (Estaras *et al.*, 2022).

O desenvolvimento e progressão do câncer estão diretamente associados à capacidade de proliferação sustentada das células cancerosas (Hanahan, 2022). Um grande conjunto de estudos relatou que a melatonina é capaz de suprimir o crescimento e a proliferação de células cancerosas (Favero *et al.*, 2018). Diferentes vias de sinalização foram sugeridas como alvos para inibir a proliferação descontrolada no câncer, como as vias de sinalização do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), em que o tratamento com melatonina tanto *in vitro* quanto em modelo animal demonstrou reduzir a proliferação celular pela modulação dessa proteína (Park *et al.*, 2010; Zonta *et al.*, 2017). Também a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3Ks), uma família de lipídios quinases que está envolvida na regulação de muitos mecanismos celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular (Talib, 2018). Vários estudos relataram o efeito inibitório da melatonina na via de sinalização PI3K, a proliferação de células de câncer de mama e de melanoma foi inibida após o tratamento com melatonina a partir da inibição da via de sinalização PI3K (Kim, Kim e Yoo, 2014; Wang *et al.*, 2012). No presente estudo também foi possível observar o efeito da melatonina na supressão da proliferação celular das células de adenocarcinoma pancreático humanas PANC-1.

Em concordância, foi demonstrado que o efeito antitumoral da melatonina está relacionando a sua capacidade oncostática. O tratamento com melatonina interrompe o ciclo celular na fase G₀/G₁ e evita o avanço do ciclo celular para a fase seguinte (S e G₂/M) em linhagens de câncer de ovário e osteossarcoma (Liu, Xu e Reiter, 2013; Samanta, 2022; Shen *et al.*, 2016). Esse efeito pode ser explicado devido a regulação negativa pela melatonina da ciclina D1, ciclina B1 e quinases dependentes de ciclina (CDK) 4 e 1 que são alguns dos principais componentes reguladores que determinam a progressão do ciclo celular de um estágio mitótico para o próximo (Talib, 2018). Dessa maneira, a capacidade de modular a progressão do ciclo celular evidencia o potencial antitumoral da melatonina, efeito também observado neste trabalho, onde a melatonina aprisionou as células de adenocarcinoma ductal pancreático humanas PANC-1 na fase G₁ do ciclo celular e reduziu as células em fase S.

O aumento da fragmentação de DNA é um indicativo de citotoxicidade, estudos recentes associam a fragmentação nuclear a diferentes tipos de morte celular, como apoptose e piroptose (Lu *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2021). A melatonina aumentou a fragmentação nuclear de células de câncer cervical (Pariente *et al.*, 2016) em combinação com quimioterápicos e em um modelo animal de câncer de mama murino, esse aumento também foi observado nas células da massa tumoral (Pariente *et al.*, 2016). Esses achados

vão de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho, em que o estímulo com melatonina nas células PANC-1 aumentou de maneira dose-dependente a fragmentação de DNA.

A reprogramação do metabolismo lipídico é uma característica bem reconhecida de malignidade no contexto tumoral. O aumento na absorção, armazenamento e biogênese de lipídios ocorre em diversos tipos de cânceres, contribuindo para o rápido crescimento das células cancerosas (Antunes *et al.*, 2022). Os lipídios desempenham um papel crucial não apenas como componentes estruturais das membranas celulares, mas também como moléculas sinalizadoras e fontes de energia vital (Cheng *et al.*, 2018). Corpúsculos Lipídicos (CLs) são organelas intracelulares dinâmicas que armazenam lipídios neutros. Eles exercem uma função significativa na síntese de eicosanoides, que são mediadores inflamatórios como leucotrienos e prostaglandinas. Esses eicosanoides têm um impacto direto na ativação celular, migração, proliferação e apoptose, todos essenciais para os processos de carcinogênese. Notavelmente, os CLs são mais prevalentes em células envolvidas em respostas inflamatórias e processos neoplásicos, enfatizando sua importância fundamental no desenvolvimento do câncer (Bozza e Viola, 2010).

A hipóxia, um ambiente comum em tumores, regula a absorção de lipídios e a formação de CLs, nesse sentido, o direcionamento do metabolismo lipídico tanto nas células cancerosas quanto no estroma tem se mostrado uma estratégia promissora na busca por novas abordagens terapêuticas contra o câncer de pâncreas (Sunami, Rebelo e Kleeff, 2017). Estudos recentes também indicam o potencial regulador da melatonina no metabolismo lipídico (Liu *et al.*, 2019), em um estudo com carcinoma de células renais a melatonina ativa a autofagia lipídica dependente da proteína desacopladora 1 (UCP1) para provocar um estado catabólico de corpúsculos lipídicos, suprimindo assim a progressão tumoral (Xiao *et al.*, 2019). Sabendo disso, o presente estudo também avaliou o efeito da melatonina na biogênese de corpúsculos lipídicos e também foi possível observar a redução dessas organelas nas células PANC-1 estimuladas com melatonina. Em conjunto com os efeitos antiproliferativos e oncostáticos observados nesse trabalho, estes resultados sugerem uma relação entre a redução de corpúsculos lipídicos com o efeito antitumoral da melatonina, contudo, a fim de associar esse efeito com a citotoxicidade apresentada pela melatonina são necessárias análises adicionais que visem avaliar isoladamente o papel dos corpúsculos lipídicos no ADP.

A resistência e evasão das vias de morte celular são características distintivas das células cancerosas, despertando um interesse crescente no desenvolvimento de terapias

voltadas para a citotoxicidade e a indução de morte celular como estratégias de combate ao câncer (Block *et al.*, 2015). As células tumorais têm a capacidade de contornar a apoptose ao superexpressar proteínas anti-apoptóticas, que bloqueiam esse processo fundamental de autodestruição celular. Diversas vias são responsáveis por essa evasão da apoptose no contexto do câncer, o mais comum é a perda da função supressora de tumor TP53, que elimina esse sensor de dano crítico do circuito indutor de apoptose, bem como a superexpressão de moléculas que conferem resistência, como é observado na família de proteínas Bcl-2, e a regulação negativa da proteína BAX conhecida por sua ação pró-apoptótica (Hanahan, 2022).

A melatonina exibe uma interessante dualidade em seu efeito sobre as células tumorais, em que pode causar danos ao material genético dessas células, potencialmente levando à morte celular e/ou inibindo seu crescimento descontrolado, contrastantes com seu efeito protetor em células normais (Santoro *et al.*, 2012). Diversos estudos indicam que a melatonina pode induzir citotoxicidade em células cancerosas, especialmente em concentrações mais elevadas. Um trabalho com células de câncer de próstata mostrou que a melatonina pode estimular a apoptose de forma dose-dependente, resultando em uma significativa redução na viabilidade celular (Kim e Yoo, 2010). Mecanismos propostos incluem a ativação de vias de sinalização como a do p53 e das MAPKs, bem como a inibição do fator NF- κ B, conhecido por seu papel antiapoptótico, relatados em estudos realizados com células de câncer gástrico (Li *et al.*, 2015).

Resultados variados foram observados em diferentes linhagens celulares tumorais, enquanto em células de câncer de mama a melatonina demonstrou induzir apoptose e suprimir a expressão de Bcl-2, em células de melanoma, os efeitos foram mais variáveis, indicando possíveis vias distintas de ativação (Gatti *et al.*, 2017). Essas discrepâncias podem ser atribuídas à influência da concentração de melatonina, com concentrações mais elevadas sendo associadas ao maior efeito citotóxico. Embora alguns estudos tenham relatado uma falta de aumento na indução de apoptose em resposta ao tratamento com melatonina em certos tipos de células de câncer (Bizzarri *et al.*, 2013), isso pode ser atribuído a uma possível necessidade de doses mais elevadas para observar esse efeito. Em geral, a indução da apoptose pela melatonina parece ser altamente dependente da concentração e do tipo de célula em questão (Farhood *et al.*, 2019).

De maneira similar, observamos no presente trabalho o efeito citotóxico da melatonina, principalmente em concentrações mais altas e em tempos mais tardios de tratamento nas células PANC-1, pelos ensaios de MTT e Anexina V e PI.

Surpreendentemente, em contradição com que já foi descrito anteriormente, em células de adenocarcinoma pancreático (Leja-Szpak *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013), a melatonina não aumentou a ocorrência de morte apoptótica, mas sim de outro tipo de morte celular com perfil lítico em nossos resultados.

Embora as vias de sinalização apoptótica tenham sido há muito tempo o foco principal na descoberta de medicamentos para o tratamento do câncer, é cada vez mais reconhecido que a indução exclusiva de apoptose pode levar ao desenvolvimento de resistência terapêutica. Portanto, a compreensão mais abrangente das vias de morte celular está impulsionando a busca por novos alvos terapêuticos. Além disso, estratégias de tratamento combinado que visam múltiplas vias simultaneamente podem ser eficazes para superar os mecanismos de resistência e melhorar os resultados clínicos (Hadian e Stockwell, 2023).

A piroptose é um tipo de morte celular lítica inflamatória que tem recebido destaque na pesquisa sobre câncer nos últimos anos. É interessante notar que alguns medicamentos quimioterápicos clinicamente utilizados foram identificados como atuantes por meio desse mecanismo (Wang *et al.*, 2017). Além disso, a piroptose já foi observada em outros tratamentos, como terapias baseadas em nanomedicina (Zhang *et al.*, 2022).

No contexto do câncer, a piroptose pode apresentar um efeito dual, tanto promovendo a morte das células cancerosas quanto contribuindo para a inflamação no microambiente tumoral. Essa inflamação pode favorecer o recrutamento imunológico e facilitar o tratamento antitumoral ou também pode favorecer a tumorigênese (Yu *et al.*, 2021). Essa dualidade sugere que a piroptose desempenha um papel complexo e multifacetado no desenvolvimento e progressão do câncer, o que destaca a importância de investigar esse fenômeno no ADP, dado a ausência de estudos nesse contexto (Chen *et al.*, 2021).

As características morfológicas da morte celular por piroptose são diferentes das características observadas na apoptose. Da mesma maneira, diferentemente da ruptura explosiva da membrana plasmática associada à necrose, a piroptose causa achatamento do citoplasma devido a permeabilidade da membrana. A ativação de caspases ou liberação de granzimas resulta na oligomerização N-terminal da gasdermina e na formação de poros de aproximadamente 1–2 μm de diâmetro na membrana plasmática, o que permite citocinas e alarminas como IL-1 β /IL-18 maduras e caspase-1 (diâmetro de 7,5 nm) a passarem. Assim, as células piroptóticas são permeáveis a sondas como iodeto de propídeo (PI). Ao contrário das células piroptóticas, as células apoptóticas mantêm a integridade da membrana, de

modo que este corante não pode marcar o material genético. Curiosamente, semelhante às células apoptóticas, a Anexina V também marca células piroptóticas e o corante se liga à fosfatidilserina (PS). Portanto, a Anexina V não consegue diferenciar células apoptóticas de células piroptóticas (Zhang *et al.*, 2018). A fim de investigar se a piroptose estaria sendo a morte induzida pela melatonina nas células PANC-1, o presente estudo buscou avaliar os mecanismos associados.

Nossos resultados sugerem que a piroptose é o tipo de morte predominantemente induzida pela melatonina, em doses farmacológicas (2,5mM – 5mM) nas células PANC-1, pois foi possível observar a perda da integridade da membrana plasmática das células PANC-1 a partir da captação do iodeto de propídeo de maneira dose-dependente. Para maiores esclarecimentos, avaliamos o nível extracelular de LDH, que é um marcador clássico de citotoxicidade celular piroptótica (Tan *et al.*, 2021), em que observamos a liberação dessa enzima pelas células PANC-1 estimuladas com a melatonina. Em concordância, também observamos a ativação de caspase-1, que desempenha um papel central na morte celular por piroptose (Yu *et al.*, 2021).

A maturação e liberação de citocinas é uma marca da piroptose descrita em células imunológicas. Contudo, em células cancerosas esse fenômeno nem sempre é observado (Kong e Zhang, 2023). Inicialmente esperava-se como resultado deste trabalho que as células PANC-1 estimuladas com melatonina aumentassem a liberação da citocina IL-1 β , visto que observamos a ativação de caspase-1. Contudo, não observamos esse efeito, não houve modulação no perfil de secreção desta citocina pelas células PANC-1 estimuladas com melatonina. É possível que a secreção dessa citocina aconteça em tempos mais precoces, e passado o tempo de estímulo em análise (24h) já tenha sido degradada. Todavia, é necessário que tal evento seja analisado. Porém, é possível que de fato não esteja ocorrendo a liberação dessa molécula, pois já é descrito que esta é uma característica observada na piroptose associada ao câncer (Kong e Zhang, 2023). Além disso, a IL-1 β possui um papel controverso no contexto tumoral (Bent *et al.*, 2018), em um estudo com modelo animal de câncer de pâncreas a IL-1 β derivada de células tumorais foi associada a imunomodulação que apoia a tumorigênese pancreática (Das *et al.*, 2020).

Desse mesmo modo, não observamos modulação no perfil de secreção da citocina IL-6, que no contexto do câncer é conhecida por seu efeito pró-tumoral e pró-caquético (Han *et al.*, 2018). No presente trabalho foi possível observar um pequeno aumento na secreção da citocina pró inflamatória TNF- α pelas células PANC-1 estimuladas com melatonina. Sabe-se que a citocina TNF- α está associada também a indução da piroptose,

a caspase-3 pode induzir piroptose pela GSDME sob certas condições, como na presença de TNF- α , alta expressão de GSDME ou certos agentes quimioterápicos (Wang *et al.*, 2017) e também foi descrito que o TNF- α derivado de macrófagos, fármacos ou quimioterapia pode induzir piroptose através de GSDMC em células de câncer de mama (Hou *et al.*, 2020).

A autofagia é um processo complexo que desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase celular, removendo proteínas e organelas danificadas durante o estresse celular. Embora geralmente seja considerada pró-sobrevivência, a autofagia excessiva ou inadequada pode levar à morte celular. Estudos demonstraram que a melatonina pode induzir a autofagia em células cancerosas, mas também pode inibir esse processo em determinadas situações (Mehrzadi *et al.*, 2021). Além disso, o lisossoma desempenha um papel crucial na ativação da piroptose. A ruptura lisossomal causada por compostos químicos, libera catepsina B, que ativa o inflamassoma NLRP3 e leva a ativação da caspase-1. A produção de ROS e o efluxo de potássio (K⁺) após a ruptura lisossomal também contribuem para a ativação do inflamassoma. A permeabilização lisossomal causada por HMGB1 também permite execução da piroptose pela via não canônica, promovendo a morte celular (Alu *et al.*, 2020). No presente estudo observamos que o estímulo com doses farmacológicas de melatonina causou um aumento da acidificação lisossomal das células PANC-1, indicativo de dano lisossomal que pode ser associado a morte celular por piroptose.

Embora a melatonina seja descrita principalmente como uma molécula antioxidante, algumas evidências recentes sugerem que a melatonina pode ter ações pró-oxidantes em algumas células. Mais especificamente, a melatonina funciona como um pró-oxidante nas células cancerosas, auxiliando na morte celular (Proietti *et al.*, 2017). No contexto da morte celular por piroptose a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) é descrita como um dos mais importantes segundos sinais para indução desse tipo de morte (Evavold *et al.*, 2021). Um estudo descreveu o papel de ROS na indução de piroptose em células de câncer pancreático que resultou na supressão da proliferação e migração do ADP tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Cui *et al.*, 2019). No presente trabalho também foi possível observar o mesmo fenômeno, ao estimular as células PANC-1 com concentrações farmacológicas de melatonina, observamos um aumento na geração de espécies reativas dessas células já nos estágios iniciais de tratamento. Contudo, ao avaliar a presença de ROS em um tempo tardio, após 24h de estímulo, observamos que houve a redução de ROS e hipotetizamos duas justificativas para tal efeito. A primeira baseia-se no fato das células

já estarem em processo final de morte celular, e ROS não estarem mais sendo produzidas. A segunda baseia-se na ativação de enzimas antioxidantes para eliminação de ROS. Ambas as hipóteses ainda serão avaliadas para fins de comprovação.

Ainda com a intenção de verificar se a geração de ROS estaria relacionada a indução de morte celular por piroptose, foi analisado no presente estudo o efeito da melatonina na alteração da permeabilidade da membrana plasmática das células PANC-1, a partir da captação de iodeto de propídeo (PI) na presença e ausência do inibidor farmacológico de ROS: N-acetilcisteína (NAC). Em concordância com a nossa hipótese, na presença de NAC a melatonina não foi capaz de induzir a formação de poros na membrana plasmática das células PANC-1, confirmando a relação entre ROS e piroptose. Contudo, em concentrações mais elevadas de melatonina (5mM), mesmo na presença de NAC, foi possível observar a indução da piroptose, podem ser necessários ajustes na concentração do inibidor utilizado ou tal efeito observado pode ser mediado por outras moléculas.

A melatonina e as mitocôndrias têm um envolvimento antigo, bem estabelecido e documentado, e seu crosstalk é finamente orquestrado, dependendo do perfil da célula a melatonina protege as mitocôndrias de células saudáveis, mas não tem o mesmo efeito nas células cancerosas (Proietti *et al.*, 2017). O efeito farmacológico da melatonina na regulação das funções mitocondriais no câncer inclui a capacidade de regular a cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo assim o estado altamente glicolítico das células (Reiter *et al.*, 2020). A modulação da cadeia respiratória mitocondrial, juntamente com a liberação de Ca^{2+} e efetores apoptóticos mitocondriais, pode aumentar os processos de morte celular (Proietti *et al.*, 2017). Embora as mitocôndrias estejam fortemente relacionadas à apoptose, elas também são relevantes para outros tipos de morte celular, incluindo a piroptose (Almeida Chuffa, de *et al.*, 2019). Em um estudo com células de prolactinoma a melatonina inibiu complexos da cadeia respiratória causando disfunção mitocondrial, encolhimento, aumento de ROS e morte celular por apoptose (Bao-qiang *et al.*, 2013), em outro estudo com células de carcinoma espinocelular humano a melatonina em associação com a verteporfina induziram a despolarização mitocondrial e inibiram a função mitocondrial (Shin *et al.*, 2022). No presente trabalho observamos as alterações nas mitocôndrias das células PANC-1 estimuladas com melatonina e também foi possível observar que o tratamento alterou a rede interligada de mitocôndrias, causou um encolhimento mitocondrial e localização perinuclear. Estes resultados sugerem que a melatonina desencadeia danos mitocondriais nas células PANC-1. Contudo, análises adicionais são

necessárias, e como avaliação de marcadores de mitofagia, capacidade respiratória e proteínas relacionadas a disfunção mitocondrial.

Este é o primeiro estudo a caracterizar a indução de piroptose em células de câncer pancreático pela melatonina. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho sugere-se que a melatonina apresenta efeitos citostáticos em células PANC-1 bem como atua por diferentes mecanismos aumentando a sinalização para indução de morte celular por piroptose, como a geração de ROS e danos a membrana lisossomal. Como perspectivas para esse estudo objetivamos realizar análises adicionais de marcadores específicos de piroptose, como a dosagem da liberação de alarminas envolvidas nesse processo como ATP e HMGB-1, bem como a análise da clivagem de Gasderminas. Também objetivamos analisar alterações morfológicas das mitocôndrias e proteínas relacionadas a dinâmica mitocondrial.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a melatonina modulou parâmetros carcinogênicos das células PANC-1, apresentando efeito citostático e citotóxico, pois foi possível observar que:

- A melatonina reduziu a viabilidade celular mitocondrial de células PANC-1;
- A melatonina induziu morte celular em células PANC-1 em um perfil majoritariamente lítico;
- A melatonina modulou a progressão do ciclo celular, aprisionando as células na fase G1 e reduzindo as células em fase S e aumentou a fragmentação nuclear de células PANC-1;
- A melatonina reduziu a proliferação celular de células PANC-1;
- A melatonina reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos de células PANC-1;

Além disso, foi possível caracterizar que a melatonina induz morte celular por piroptose nas células PANC-1, observando que:

- A melatonina induziu a formação de poros na membrana plasmática de células PANC-1;
- A melatonina induziu a liberação de LDH pelas células PANC-1;
- A melatonina induziu a ativação de Caspase-1 em células PANC-1;
- A melatonina não modulou a secreção de citocinas IL-1 β e IL-6, mas aumentou a secreção de TNF- α pelas células PANC-1;
- A melatonina aumentou a acidificação lisossomal de células PANC-1;
- A melatonina aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio em células PANC-1;
- A melatonina induz a formação de poros na membrana plasmática de maneira dependente de ROS;
- A melatonina alterou a morfologia mitocondrial de células PANC-1.

Esse trabalho destaca o potencial efeito antitumoral da melatonina contra células de câncer pancreático *in vitro*, apontando para novas possibilidades terapêuticas que poderiam ser exploradas como ferramentas importantes no tratamento dessa doença.

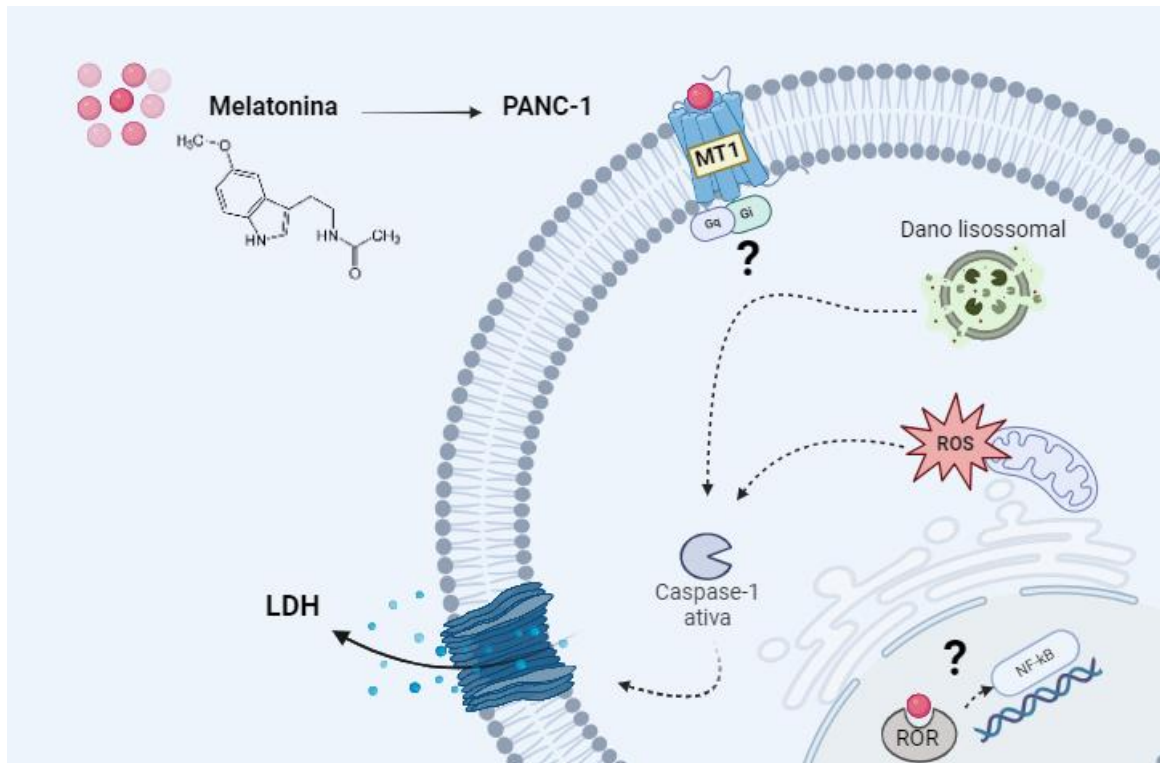


Figura 25. O Papel da melatonina em células de adenocarcinoma pancreático humano PANC-1. A melatonina apresenta efeitos citostáticos e citotóxicos em células PANC-1 induzindo a morte celular por piroptose caracterizada pela formação de poros na membrana plasmática, liberação de LDH e ativação de caspase 1. Segundos sinais de ativação como dano lisossomal e geração de espécies reativas de oxigênio estão envolvidos nesse processo. Hipotetiza-se que o primeiro sinal de ativação pode ser via receptor de membrana MT1 ou receptor nuclear. MT1: Receptor de melatonina; ROS: Espécies reativas de oxigênio; ROR: Receptor órfão retinóide; LDH: Lactato desidrogenase (Fonte: autoria própria – criado utilizando BioRender.com).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M. E.; LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, L. C.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.-X.; REITER, R. J. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997–3025, 2014.

ALMEIDA CHUFFA, L. G. DE; SEIVA, F. R. F.; CUCIELO, M. S.; SILVEIRA, H. S.; REITER, R. J.; LUPI, L. A. Mitochondrial functions and melatonin: a tour of the reproductive cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 5, p. 837–863, 2019.

ALU, A.; HAN, X.; MA, X.; WU, M.; WEI, Y.; WEI, X. The role of lysosome in regulated necrosis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 10, p. 1880–1903, 2020.

AMARAL, F. G. DO; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472–479, ago. 2018.

ANTUNES, P.; CRUZ, A.; BARBOSA, J.; BONIFÁCIO, V. D. B.; PINTO, S. N. Lipid Droplets in Cancer: From Composition and Role to Imaging and Therapeutics. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 3, fev. 2022.

BAO-QIANG, W.; QUAN-HUI, Y.; RONG-KUN, X. U.; JIAN-NING, X. U. Elevated levels of mitochondrial respiratory complexes activities and ATP production in 17- β -estradiol-induced prolactin-secreting tumor cells in male rats are inhibited by melatonin in vivo and in vitro. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 24, p. 4724–4730, 20 dez. 2013.

BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897–909, 2002.

BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, jul. 2018.

BIZZARRI, M.; PROIETTI, S.; CUCINA, A.; REITER, R. J. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 12, p. 1483–1496, dez. 2013.

BLOCK, K. I. *et al.* Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. **Seminars in cancer biology**, v. 35 Suppl, n. Suppl, p. S276–S304, dez. 2015.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 82, n. 4–6, p. 243–250, 2010.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407–420, jul. 2016.

CAI, H.; LV, M.; WANG, T. PANoptosis in cancer, the triangle of cell death. **Cancer medicine**, v. 12, n. 24, p. 22206–22223, dez. 2023.

CECON, E.; OISHI, A.; JOCKERS, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 16, p. 3263–3280, ago. 2018.

CHAO, Y.; WU, K.; YEH, C.; SU, S.; REITER, R. J.; YANG, S. The potential utility of melatonin in the treatment of childhood cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 11, p. 19158–19166, 2019.

CHEN, X.; ZEH, H. J.; KANG, R.; KROEMER, G.; TANG, D. Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 11, p. 804–823, 2021.

CHENG, C.; GENG, F.; CHENG, X.; GUO, D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. **Cancer communications (London, England)**, v. 38, n. 1, p. 27, maio 2018.

CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. Melatonin: Physiological effects in humans. **Neurochirurgie**, v. 61, n. 2, p. 77–84, 2015.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 113–114, 2001.

CUI, J.; ZHOU, Z.; YANG, H.; JIAO, F.; LI, N.; GAO, Y.; WANG, L.; CHEN, J.; QUAN, M. MST1 suppresses pancreatic cancer progression via ROS-induced pyroptosis. **Molecular Cancer Research**, v. 17, n. 6, p. 1316–1325, 2019.

DAS, S.; SHAPIRO, B.; VUCIC, E. A.; VOGT, S.; BAR-SAGI, D. Tumor Cell-Derived IL1 β Promotes Desmoplasia and Immune Suppression in Pancreatic Cancer. **Cancer research**, v. 80, n. 5, p. 1088–1101, mar. 2020.

DAVOODVANDI, A.; NIKFAR, B.; REITER, R. J.; ASEMI, Z. Melatonin and cancer suppression: insights into its effects on DNA methylation. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 27, n. 1, p. 73, 2022.

ESTARAS, M.; MARTINEZ, R.; GARCIA, A.; ORTIZ-PLACIN, C.; IOVANNA, J. L.; SANTOFIMIA-CASTAÑO, P.; GONZALEZ, A. Melatonin modulates metabolic adaptation of pancreatic stellate cells subjected to hypoxia. **Biochemical Pharmacology**, v. 202, p. 115118, 2022.

EVAVOLD, C. L.; HAFNER-BRATKOVIČ, I.; DEVANT, P.; D'ANDREA, J. M.; NGWA, E. M.; BORŠIĆ, E.; DOENCH, J. G.; LAFLEUR, M. W.; SHARPE, A. H.; THIAGARAJAH, J. R.; KAGAN, J. C. Control of gasdermin D oligomerization and

pyroptosis by the Regulator-Rag-mTORC1 pathway. **Cell**, v. 184, n. 17, p. 4495- 4511.e19, 2021.

FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A.; FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, 2020.

FARHOOD, B.; GORADEL, N. H.; MORTEZAEE, K.; KHANLARKHANI, N.; NAJAFI, M.; SAHEBKAR, A. Melatonin and cancer: From the promotion of genomic stability to use in cancer treatment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5613–5627, 1 maio 2019.

FAVERO, G.; MORETTI, E.; BONOMINI, F.; REITER, R. J.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Promising Antineoplastic Actions of Melatonin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1086, 16 out. 2018.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell death and differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, mar. 2018.

GATTI, G.; LUCINI, V.; DUGNANI, S.; CALASTRETTI, A.; SPADONI, G.; BEDINI, A.; RIVARA, S.; MOR, M.; CANTI, G.; SCAGLIONE, F.; BEVILACQUA, A. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of melatonin analogues on melanoma and breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 68338–68353, set. 2017.

HADIAN, K.; STOCKWELL, B. R. The therapeutic potential of targeting regulated non-apoptotic cell death. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 22, n. 9, p. 723–742, 2023.

HAGHI-AMINJAN, H.; FARHOOD, B.; RAHIMIFARD, M.; DIDARI, T.; BAEERI, M.; HASSANI, S.; HOSSEINI, R.; ABDOLLAHI, M. The protective role of melatonin in chemotherapy-induced nephrotoxicity: a systematic review of non-clinical studies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 14, n. 9, p. 937–950, 2 set. 2018.

HAN, J.; MENG, Q.; SHEN, L.; WU, G. Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 14, 2018.

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

HARDELAND, R. Melatonin metabolism in the central nervous system. **Current neuropharmacology**, v. 8, n. 3, p. 168–181, set. 2010.

—. Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks.

International journal of molecular sciences, v. 20, n. 5, mar. 2019.

HOU, J. *et al.* PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis. **Nature cell biology**, v. 22, n. 10, p. 1264–1275, out. 2020.

HU, Z. I.; O'REILLY, E. M. Therapeutic developments in pancreatic cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 21, n. 1, p. 7–24, 2024.

JOCKERS, R.; DELAGRANGE, P.; DUBOCOVICH, M. L.; MARKUS, R. P.; RENAULT, N.; TOSINI, G.; CECON, E.; ZLOTOS, D. P. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 18, p. 2702–2725, set. 2016.

KIM, C. H.; YOO, Y.-M. Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via p53 in LNCaP Cells. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 14, n. 6, p. 365–369, dez. 2010.

KIM, H. S.; KIM, T.-J.; YOO, Y.-M. Melatonin combined with endoplasmic reticulum stress induces cell death via the PI3K/Akt/mTOR pathway in B16F10 melanoma cells. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92627, 2014.

KLEEFF, J.; KORC, M.; APTE, M.; VECCHIA, C. LA; JOHNSON, C. D.; BIANKIN, A. V; NEALE, R. E.; TEMPERO, M.; TUVESON, D. A.; HRUBAN, R. H.; NEOPTOLEMOS, J. P. Pancreatic cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16022, 2016.

KONG, Q.; ZHANG, Z. **Cancer-associated pyroptosis: A new license to kill tumor** **Frontiers in Immunology**, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1082165>>

KOPEINA, G. S.; ZHIVOTOVSKY, B. Programmed cell death: Past, present and future. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 633, p. 55–58, 2022.

LABORDA-ILLANES, A.; SÁNCHEZ-ALCOHOLADO, L.; BOUTRIQ, S.; PLAZA-ANDRADES, I.; PERALTA-LINERO, J.; ALBA, E.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. A New Paradigm in the Relationship between Melatonin and Breast Cancer: Gut Microbiota Identified as a Potential Regulatory Agent. **Cancers**, v. 13, n. 13, jun. 2021.

LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 213–220, mar. 2011.

LEJA-SZPAK, A.; JAWOREK, J.; PIERZCHALSKI, P.; REITER, R. J. Melatonin

induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). **Journal of pineal research**, v. 49, n. 3, p. 248–255, out. 2010.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. **Journal of the american chemical society**, v. 80, n. 10, p. 2587, 1958.

LI, W.; FAN, M.; CHEN, Y.; ZHAO, Q.; SONG, C.; YAN, Y.; JIN, Y.; HUANG, Z.; LIN, C.; WU, J. 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. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 37, n. 6, p. 2323–2338, 2015.

LIU, K.; YU, W.; WEI, W.; ZHANG, X.; TIAN, Y.; SHERIF, M.; LIU, X.; DONG, C.; WU, W.; ZHANG, L.; CHEN, J. Melatonin reduces intramuscular fat deposition by promoting lipolysis and increasing mitochondrial function. **Journal of lipid research**, v. 60, n. 4, p. 767–782, abr. 2019.

LIU, L.; XU, Y.; REITER, R. J. Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63. **Bone**, v. 55, n. 2, p. 432–438, ago. 2013.

LOOI, C. K.; CHUNG, F. F. L.; LEONG, C. O.; WONG, S. F.; ROSLI, R.; MAI, C. W. Therapeutic challenges and current immunomodulatory strategies in targeting the immunosuppressive pancreatic tumor microenvironment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1–23, 2019.

LU, L. *et al.* Emerging mechanisms of pyroptosis and its therapeutic strategy in cancer. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 338, 2022.

MEDINA, C. B. *et al.* Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. **Nature**, v. 580, n. 7801, p. 130–135, abr. 2020.

MEHRZADI, S.; POURHANIFEH, M. H.; MIRZAEI, A.; MORADIAN, F.; HOSSEINZADEH, A. An updated review of mechanistic potentials of melatonin against cancer: pivotal roles in angiogenesis, apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 188, 2021.

NAJAFI, M.; SHIRAZI, A.; MOTEVASELI, E.; REZAEYAN, A. H.; SALAJEGHEH, A.; REZAPOOR, S. Melatonin as an anti-inflammatory agent in radiotherapy. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 403–413, ago. 2017.

NCI. **What Is Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>.

ORNING, P. *et al.* Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. **Science (New York, N.Y.)**, v. 362, n. 6418, p. 1064–1069, nov. 2018.

Panc-1 - Crl-1469 | Atcc. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/crl-1469>>.

PARIENTE, R.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A. B.; ESPINO, J. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. **Journal of pineal research**, v. 60, n. 1, p. 55–64, jan. 2016.

PARK, S.-Y.; JANG, W.-J.; YI, E.-Y.; JANG, J.-Y.; JUNG, Y.; JEONG, J.-W.; KIM, Y.-J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. **Journal of pineal research**, v. 48, n. 2, p. 178–184, mar. 2010.

PARK, W.; CHAWLA, A.; REILLY, E. M. O. Pancreatic Cancer: A Review. v. 326, n. 9, p. 851–862, 2022.

PENG, F.; LIAO, M.; QIN, R.; ZHU, S.; PENG, C.; FU, L.; CHEN, Y.; HAN, B. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 286, ago. 2022.

POTHULA, S. P.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S.; APTE, M. V. Pancreatic stellate cells: Aiding and abetting pancreatic cancer progression. **Pancreatology**, v. 20, n. 3, p. 409–418, 2020.

PROIETTI, S.; CUCINA, A.; MININI, M.; BIZZARRI, M. Melatonin, mitochondria, and the cancer cell. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 21, p. 4015–4025, 2017.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; GADUPUTI, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. **World journal of oncology**, v. 10, n. 1, p. 10–27, fev. 2019.

REITER, R. J.; MAYO, J. C.; TAN, D.-X.; SAINZ, R. M.; ALATORRE-JIMENEZ, M.; QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–278, 1 out. 2016.

REITER, R. J.; SHARMA, R.; MA, Q.; RORSALES-CORRAL, S.; ALMEIDA CHUFFA, L. G. DE. Melatonin inhibits Warburg-dependent cancer by redirecting glucose oxidation to the mitochondria: a mechanistic hypothesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 13, p. 2527–2542, 2020.

SAMANTA, S. Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 128, n. 5, p. 1346–1367, 3 set. 2022.

SANTORO, R.; MARANI, M.; BLANDINO, G.; MUTI, P.; STRANO, S. Melatonin triggers p53Ser phosphorylation and prevents DNA damage accumulation. **Oncogene**, v. 31, n. 24, p. 2931–2942, jun. 2012.

SANTOS, M. DE O.; LIMA, F. C. DA S. DE; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M. DE; CANCELA, M. DE C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1 SE-ARTIGO ORIGINAL, p. e-213700, 6 fev. 2023.

SHEN, C.-J.; CHANG, C.-C.; CHEN, Y.-T.; LAI, C.-S.; HSU, Y.-C. Melatonin Suppresses the Growth of Ovarian Cancer Cell Lines (OVCAR-429 and PA-1) and Potentiates the Effect of G1 Arrest by Targeting CDKs. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, jan. 2016.

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; GAO, W.; DING, J.; LI, P.; HU, L.; SHAO, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 187–192, out. 2014.

SHIN, Y. Y.; SEO, Y.; OH, S.-J.; AHN, J.-S.; SONG, M.; KANG, M.-J.; OH, J.-M.; LEE, D.; KIM, Y. H.; SUNG, E.-S.; KIM, H.-S. Melatonin and verteporfin synergistically suppress the growth and stemness of head and neck squamous cell carcinoma through the regulation of mitochondrial dynamics. **Journal of Pineal Research**, v. 72, n. 1, p. e12779, 1 jan. 2022.

SLIWINSKI, T.; ROZEJ, W.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; REITER, R.; BLASIAK, J. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. **Mutation research**, v. 634, n. 1–2, p. 220–227, dez. 2007.

SPRINGFELD, C.; FERRONE, C. R.; KATZ, M. H. G.; PHILIP, P. A.; HONG, T. S.; HACKERT, T.; BÜCHLER, M. W.; NEOPTOLEMOS, J. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 20, n. 5, p. 318–337, 2023.

SUNAMI, Y.; REBELO, A.; KLEEFF, J. Lipid Metabolism and Lipid Droplets in Pancreatic Cancer and Stellate Cells. **Cancers**, v. 10, n. 1, dez. 2017.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. 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, n. 3, p. 209–249, 1 maio 2021.

SWANSON, K. V; DENG, M.; TING, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature reviews. Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477–489, ago. 2019.

TABASSUM, D. P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 473–483, 2015.

TALIB, W. H. **Melatonin and Cancer HallmarksMolecules**, 2018.

TAN, D.-X.; ZHENG, X.; KONG, J.; MANCHESTER, L. C.; HARDELAND, R.; KIM, S. J.; XU, X.; REITER, R. J. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15858–15890, set. 2014.

TAN, Y.; CHEN, Q.; LI, XIAOLING; ZENG, Z.; XIONG, W.; LI, G.; LI, XIAYU; YANG, J.; XIANG, B.; YI, M. Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, p. 153, 2021.

TONG, X.; TANG, R.; XIAO, M.; XU, J.; WANG, W.; ZHANG, B.; LIU, J.; YU, X.; SHI, S. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. **Journal of hematology & oncology**, v. 15, n. 1, p. 174, dez. 2022.

TRUONG, L.-H.; PAUKLIN, S. **Pancreatic Cancer Microenvironment and Cellular Composition: Current Understandings and Therapeutic ApproachesCancers**, 2021.

WANG, J.; XIAO, X.; ZHANG, Y.; SHI, D.; CHEN, W.; FU, L.; LIU, L.; XIE, F.; KANG, T.; HUANG, W.; DENG, W. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 77–90, 16 ago. 2012.

WANG, S. *et al.* The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021.

WANG, Y.; GAO, W.; SHI, X.; DING, J.; LIU, W.; HE, H.; WANG, K.; SHAO, F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. **Nature**, v. 547, n. 7661, p. 99–103, jul. 2017.

WEI, X.; XIE, F.; ZHOU, X.; WU, Y.; YAN, H.; LIU, T.; HUANG, J.; WANG, F.; ZHOU, F.; ZHANG, L. Role of pyroptosis in inflammation and cancer. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 19, n. 9, p. 971–992, 2022.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

WHO. **Cancer Tomorrow**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>>.

____. **Cancer Today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&key=total&types=1&cancers=12>>.

XIAO, W. *et al.* Melatonin/PGC1A/UCP1 promotes tumor slimming and represses tumor progression by initiating autophagy and lipid browning. **Journal of pineal research**, v. 67, n. 4, p. e12607, nov. 2019.

XU, C.; WU, A.; ZHU, H.; FANG, H.; XU, L.; YE, J.; SHEN, J. Melatonin is involved in the apoptosis and necrosis of pancreatic cancer cell line SW-1990 via modulating of Bcl-2/Bax balance. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 67, n. 2, p. 133–139, mar. 2013.

YAHYA, E. B.; ALQADHI, A. M. Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery. **Life Sciences**, v. 269, p. 119087, 2021.

YU, P.; ZHANG, X.; LIU, N.; TANG, L.; PENG, C.; CHEN, X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 128, mar. 2021.

ZHANG, Y.; CHEN, X.; GUEYDAN, C.; HAN, J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell research**, v. 28, n. 1, p. 9–21, jan. 2018.

ZHANG, Z.; ZHOU, Y.; ZHAO, S.; DING, L.; CHEN, B.; CHEN, Y. Nanomedicine-Enabled/Augmented Cell Pyroptosis for Efficient Tumor Nanotherapy. **Advanced Science**, v. 9, n. 35, p. 2203583, 1 dez. 2022.

ZHAO, D.; YU, Y.; SHEN, Y.; LIU, Q.; ZHAO, Z.; SHARMA, R.; REITER, R. J. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 249, 2019.

ZONTA, Y.; MARTINEZ, M.; CAMARGO, I.; DOMENICONI, R.; LUPI JÚNIOR, L.; PINHEIRO, P.; REITER, R.; MARTINEZ, F.; CHUFFA, L. Melatonin Reduces Angiogenesis in Serous Papillary Ovarian Carcinoma of Ethanol-Preferring Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 763, 11 abr. 2017.