

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

JULIE MATIE NODA

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A ANGIOGÊNESE  
TUMORAL NO MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE HEPÁTICA**

Porto Alegre

2017

JULIE MATIE NODA

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A ANGIOGÊNESE  
TUMORAL NO MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE HEPÁTICA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Norma Possa Marroni

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Noda, Julie Matie

Ação da melatonina sobre o estresse oxidativo e a angiogênese tumoral no modelo experimental de carcinogênese hepática / Julie Matie Noda. -- 2017. 66 f.

Orientadora: Norma Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Melatonina. 3. Estresse oxidativo. 4. Angiogênese. I. Marroni, Norma Possa , orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao finalizar este trabalho e refletir sobre tudo o que envolveu esta caminhada, é imprescindível agradecer aqueles que contribuíram para meu crescimento profissional, pessoal e que foram meu suporte ao longo desses dois anos.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Joni e Nubia. O apoio, incentivo e suporte que vocês me proporcionam foi e é fundamental para as minhas conquistas. Eu amo muito vocês e agradeço imensamente por tudo.

Ao meu namorado Geovani, por ser um companheiro incrível que mesmo longe fisicamente sempre esteve presente sendo incentivador, paciente, compreensivo e amoroso. Obrigada, eu te amo.

À Profa Dr<sup>a</sup> Norma Marroni, pelo carinho, dedicação e acolhida junto ao seu grupo de pesquisa. Sua experiência e ensinamentos foram importantes para meu crescimento profissional e científico, muito obrigada por tudo.

À Dra Silvia Bona por todos os momentos em que me ensinou, sugeriu e contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho, obrigada. Agradeço também a Dra Andrea Janz Moreira por colaborar e ser fundamental para a conclusão dessa pesquisa.

Aos professores e profissionais do nosso grupo de pesquisa por constantemente estarem auxiliando na aprimoração deste trabalho. Em especial ao Dr. Cláudio Marroni, pela assessoria, sugestões e correções necessárias. Meu reconhecimento e carinho.

Às colegas Francielli, Renata, Elizângela, Josieli e Mariana, pessoas únicas e admiráveis que tive o prazer de conhecer, pelos inúmeros momentos de auxílio científico, técnico e pessoal e também pelos momentos de descontração. Obrigada mesmo gurias!

Aos colegas do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia do HCPA, Raquel, Jéssica, Amanda, Pâmella, Gabriel, Larisse e Dra Carolina pela convivência diária, pela ajuda, por estarem presentes me incentivando e nos momentos de lazer.

Aos meus amigos queridos, agradeço pela paciência e compreensão dos momentos em que estive ausente, mas principalmente pelo apoio e amizade de vocês! Obrigada mesmo por estarem comigo nessa caminhada. Em especial,

gostaria de agradecer a Ana Laura, minha amiga e fiel escudeira pelos momentos que vivemos nesses dois anos. Amiga, o que seria de mim sem ti, obrigada mesmo! Além disso, agradeço imensamente as minhas companheiras de apartamento Isadora e Isabele, muito obrigada por esses anos juntas! Obrigada por tudo!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e todo o seu corpo docente por proporcionar aprendizagem qualificada e contribuir para meu crescimento profissional. Em especial, gostaria de agradecer ao Prof Dr. Alex Sander pelo profissionalismo e ao secretário Diego por sua atenção, disponibilidade e competência.

Agradeço ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e em especial ao Centro de Pesquisa Experimental do HCPA pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa e ter acesso a uma das melhores estruturas física, técnica, científica e profissional do Brasil. Em especial, gostaria de agradecer ao secretário Everaldo por sua eficiência, disponibilidade e paciência.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Evento do HCPA (FIPE-HCPA) pelo financiamento desse trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma hepatocelular (CHC) é o câncer primário de fígado mais comum e está associado com a segunda menor taxa de sobrevivência em 5 anos de todos os tipos de tumores. A melatonina (Mel) é uma potente molécula antioxidante que se tem mostrado benéfica em diversas situações patológicas, incluindo o CHC.

**Objetivo:** Avaliar o efeito da Mel sobre marcadores de estresse oxidativo e angiogênicos no tecido hepático de ratos Wistar no modelo experimental de carcinogênese hepática induzida por dietilnitrosamina (DEN) associado ao acetilaminofluoreno (2-AAF). **Métodos:** 32 ratos machos Wistar (150g) foram divididos em 4 grupos: Controle (CO); Controle+Mel (CO+Mel); DEN e DEN+Mel. O DEN (50mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal duas/uma vez por semana, associado a uma única dose de 2-AAF (100mg/kg). A Mel foi administrada na água de beber dos animais na concentração final de 20 mg/L e o tratamento teve início na 12ª semana perdurando até o fim das 19 semanas de experimento. O sangue dos animais foi coletado para as análises de AST, ALT, FA,  $\gamma$ -GT e amostras de fígado utilizadas para avaliar a lipoperoxidação (LPO), a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx e GST), os níveis de GSH e de metabólitos do óxido nítrico, a análise histológica e as proteínas envolvidas na angiogênese tumoral (VEGF, PI3K, p-Akt e eNOS). **Resultados:** O dano tecidual e o processo fibrogênico presentes no parênquima hepático estavam diminuídos no grupo DEN+Mel, assim como o nível de TBARS e a atividade da enzima GST quando comparados ao grupo DEN. A atividade da CAT mostrou-se aumentada no grupo DEN+Mel quando comparada ao grupo DEN. No processo angiogênico, a expressão de VEGF, PI3K, p-Akt mostrou-se diminuída no grupo DEN+Mel enquanto a expressão da eNOS apresentou-se aumentada quando comparado ao grupo DEN. **Conclusão:** Constatamos que a Mel foi capaz de minimizar os danos no parênquima hepático, de diminuir a LPO, modular a atividade da CAT, além de mostrar-se eficaz na redução de VEGF e da via PI3K/Akt no modelo experimental de carcinogênese hepática.

**Palavras-chave:** carcinoma hepatocelular, melatonina, estresse oxidativo, angiogênese.

## ABSTRACT

**Background:** Hepatocellular carcinoma (CHC) is the most common primary liver cancer and is associated with the second lowest 5-year survival rate of all tumor types. Melatonin (Mel) is a powerful antioxidant molecule that has been demonstrated to be beneficial in various pathological conditions, including HCC.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the effect of Mel on oxidative stress and angiogenic markers in liver tissue of Wistar rats in the experimental model of hepatic carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN) and acetylaminofluorene (2-AAF). **Methods:** 32 male Wistar rats (150g) were divided into 4 groups: Control (CO); Control+Mel (CO+Mel); DEN and DEN+Mel. DEN (50mg/kg) was administered intraperitoneally once or twice a week, associated with a single dose of 2-AAF (100mg/kg). Mel was given in drinking water at the final concentration of 20 mg/L and the treatment was started at 12<sup>th</sup> week and continued until the end of the 19 weeks of experiment. Blood samples were collected for AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT and liver samples were used to evaluate lipid peroxidation (LPO), activity of antioxidant enzymes (CAT, GPx and GST), levels of GSH and nitric oxide levels, histological analysis and expression of proteins involved in tumor angiogenesis (VEGF, PI3K, p-Akt and eNOS). **Results:** The tissue damage and the fibrogenic process present in the hepatic parenchyma were decreased as well as the levels of TBARS and the activity of GST in the group DEN+Mel when compared to DEN group. CAT activity was increased in DEN+Mel group when we compared with DEN group. The expression of VEGF, PI3K, p-Akt was decreased in DEN+Mel group while eNOS expression was increased when compared to DEN group. **Conclusion:** Mel was able to minimize damage in the hepatic parenchyma, reduce LPO, modulate the activity of CAT and reduce VEGF and the PI3K/Akt pathway in a experimental model of hepatic carcinogenesis.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, melatonin, oxidative stress, angiogenesis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura vascular do parênquima hepático .....	16
Figura 2: Principais células do parênquima hepático .....	17
Figura 3: Fatores de risco associados ao CHC .....	19
Figura 4: Carcinogênese hepática.....	20
Figura 5: Comparação entre fígado normal e fígado cirrótico .....	21
Figura 6: Redução do oxigênio molecular e formação de ERO .....	23
Figura 7: Reação de Fenton e Reação de Haber–Weiss .....	23
Figura 8: Ação das enzimas antioxidantes .....	25
Figura 9: Angiogênese fisiológica.....	26
Figura 10: Angiogênese tumoral .....	27
Figura 11: Via de ativação da proteína Akt na angiogênese. ....	28
Figura 12: Reação que promove a produção de NO.....	29
Figura 13: Estrutura molecular da melatonina.....	30
Figura 14: Biossíntese da Melatonina .....	30
Figura 15: Delineamento Experimental .....	34
Figura 16: Fotomicrografias do fígado dos animais em estudo coradas com Hematoxilina Eosina (HE) em aumento (10x). (.) .....	43

Figura 17: Fotomicrografias do fígado dos animais em estudo coradas com <i>Picrosirius</i> em aumento (10x).)	44
Figura 18: Efeito da administração de melatonina sobre os níveis de TBARS.)	45
Figura 19: Efeito da administração de melatonina sobre a atividade da enzima CAT.)	45
Figura 20: Efeito da administração de melatonina sobre a atividade da enzima GPx.	46
Figura 21: Efeito da administração da melatonina sobre a atividade da enzima GST..	47
Figura 22: Efeito da administração de melatonina sobre os níveis de GSH.....	47
Figura 23: Efeito do DEN e da administração de Mel na rota angiogênica. (A) Imagem representativa da análise por Western Blot. (B) Quantificação Densiométrica..	48
Figura 24: Efeito da administração de melatonina sobre os níveis de óxido nítrico (nitritos e nitratos).....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal médio (inicial e final) e a relação hepatossomática média (RH) dos animais dos diferentes grupos .....41

Tabela 2: Níveis séricos das enzimas de integridade hepática dos animais dos diferentes grupos.....42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>γ-GT</b>	Gama glutamil transferase
<b>μmol</b>	Micromol
<b>μl</b>	Microlitro
<b>2-AAF</b>	Acetilaminofluoreno
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AOX</b>	Antioxidante
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>Akt</b>	Proteína quinase B
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloroeto de carbono
<b>CDNB</b>	Clorodinitrobenzeno
<b>CEH</b>	Células estreladas hepáticas
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>CO</b>	Controle
<b>CO+Mel</b>	Controle tratado com melatonina
<b>cNOS</b>	Óxido nítrico sintase constitutiva
<b>DEN</b>	Dietilnitrosamina
<b>DEN+Mel</b>	Dietilnitrosamina tratado com melatonina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTNB</b>	Ácido 2-nitrobenzóico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino
<b>EGTA</b>	Ácido etileno glicol tetraacético
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>EO</b>	Estresse oxidativo
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato ciclíca
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona reduzida
<b>GSH</b>	Glutaciona
<b>GSSH</b>	Glutaciona oxidada
<b>GST</b>	Glutaciona S-transferase
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio

<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HE</b>	Hematoxilina eosina
<b>HIF</b>	Fatores 12nduzíveis por hipóxia
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>LPO</b>	Lipoperoxidação
<b>M</b>	Molar
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>Mel</b>	Melatonina
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
<b>nm/nmol</b>	Nanomolar
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitritos
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitratos
<b>NR</b>	Nódulos regenerativos
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup></b>	Ânion radical superóxido
<b>•OH</b>	Radical hidroxila
<b>p-Akt</b>	Proteína Akt fosforilada
<b>pmol</b>	Picomol
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-3-quinase
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>RH</b>	Relação hepatossomática
<b>RL</b>	Radical livre
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>TAA</b>	Tiocetamida
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloacético
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>u.a</b>	Unidades arbitrárias
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial
<b>VEGFR1</b>	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 1
<b>VEGFR2</b>	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 2

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 FÍGADO.....	16
2.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR .....	18
2.2.1 Carcinogênese hepática.....	19
2.2.2 Modelos experimentais em CHC .....	21
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO .....	22
2.3.1 Defesas antioxidantes .....	24
2.4 ANGIOGÊNESE .....	26
2.4.1 O fator de crescimento vascular endotelial e a via de sinalização da proteína quinase Akt .....	27
2.5 MELATONINA .....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.1.1 Animais.....	33
4.1.2 Considerações Bioéticas .....	33
4.1.3 Grupos Experimentais .....	33
4.1.4 Procedimentos experimentais .....	34
4.1.4.1 Desenvolvimento do modelo de CHC.....	34
4.1.4.2 Administração de Mel .....	34
4.1.4.3 Eutanásia e obtenção das amostras de sangue e de tecido .....	35
4.1.4.4 Biossegurança e descarte de resíduos.....	35
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	36
4.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS .....	36
4.4 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	36
4.4.1 Preparação do Homogeneizado e dosagem de proteínas .....	36
4.4.2 Determinação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico .....	37

4.4.3	Determinação da atividade da enzima Catalase .....	37
4.4.4	Determinação da atividade da enzima Glutaciona Peroxidase .....	38
4.4.5	Determinação da atividade da enzima Glutaciona S Transferase.....	38
4.4.6	Determinação da Glutaciona total .....	38
4.5.1	Preparação dos extratos citoplasmáticos e quantificação de proteínas .....	39
4.5.2	Análises da expressão das proteínas relacionadas a angiogênese tumoral .....	39
4.6	AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO .....	40
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1	ASPECTOS GERAIS DE PESO E RELAÇÃO HEPATOSSOMÁTICA .....	41
5.2	ENZIMAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA.....	41
5.3	ASPECTOS HISTOLÓGICOS.....	42
5.3.1	Avaliação por Hematoxilina Eosina .....	42
5.3.2	Avaliação por <i>Picrosirius</i> .....	43
5.4	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.....	44
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA CATALASE .....	45
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA GLUTACIONA PEROXIDASE .....	46
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA GLUTACIONA-S-TRANSFERASE.....	46
5.8	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTACIONA.....	47
5.9	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA ANGIOGÊNICA.....	48
5.10	AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NITRICO .....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia proveniente da principal célula do fígado, o hepatócito. Cerca de 70 a 90% dos casos de câncer primário de fígado que são diagnosticados em todo o mundo são CHC (Torre *et al.*, 2015). A mortalidade desse câncer está diretamente ligada ao estágio da doença no momento do diagnóstico e a seleção do tratamento (Wallace *et al.*, 2015).

Diversos fatores de risco já foram estabelecidos como iniciadores e promotores de lesões crônicas no tecido hepático, como hepatites causadas pelo vírus B e C. Essas lesões podem desencadear um estágio avançado de doença hepática crônica conhecida como cirrose, a principal causa para o desenvolvimento do CHC (Bruix *et al.*, 2014).

Os modelos experimentais de CHC foram descritos na literatura com o intuito de compreender os mecanismos moleculares que envolvem o processo de carcinogênese, bem como o estabelecimento desse câncer. Os modelos por indução química são os que mais se assemelham com as etapas da carcinogênese humana e a dietilnitrosamina (DEN) é considerada uma substância hepatocarcinogênica eficaz para o desenvolvimento de tumores hepáticos por ser potente alquilante do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Liedtke *et al.*, 2013; Tolba *et al.*, 2015).

Dentre os mecanismos moleculares que envolvem a carcinogênese hepática, o estresse oxidativo (EO) participa desde a iniciação até a progressão do CHC (Klaunig *et al.*, 1998). Aliado ao EO, a angiogênese está relacionada a progressão do tumor (Folkman, 1971), pois permite a formação de novos vasos para que as células tumorais recebam suprimento de oxigênio e nutrientes necessários para a sustentação tumoral (Wang *et al.*, 2015).

A melatonina (Mel) é uma indolamina secretada pela glândula pineal e tem como principal função em mamíferos regular o ritmo biológico. Propriedades pró-apoptóticas, anti-proliferativas e anti-angiogênicas em tumores foram descritas para essa molécula, revelando o potencial anti tumoral da Mel (Reiter *et al.*, 2014).

Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Mel sobre marcadores de EO e os angiogênicos no tecido hepático de ratos Wistar em um modelo experimental de carcinogênese hepática induzido por DEN associado ao acetilaminofluoreno (2-AAF).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FÍGADO

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano e está localizado imediatamente abaixo do diafragma no quadrante superior direito da cavidade abdominal. Esse órgão desempenha diversas funções orgânicas como o metabolismo de carboidratos e de gorduras, síntese de proteínas, produção da bile e atua como detoxificador de substâncias tóxicas potencialmente prejudiciais ao organismo (Barret, K. E., 2009).

Cerca de 75% do aporte sanguíneo do fígado é transportado pela veia porta. Esse intenso fluxo é essencial para que o fígado seja o primeiro órgão a receber os substratos metabólicos e nutricionais, bem como as substâncias tóxicas. Os 25% do fluxo sanguíneo restante são transportados pela artéria hepática (Barrett, 2014) (Figura 1).

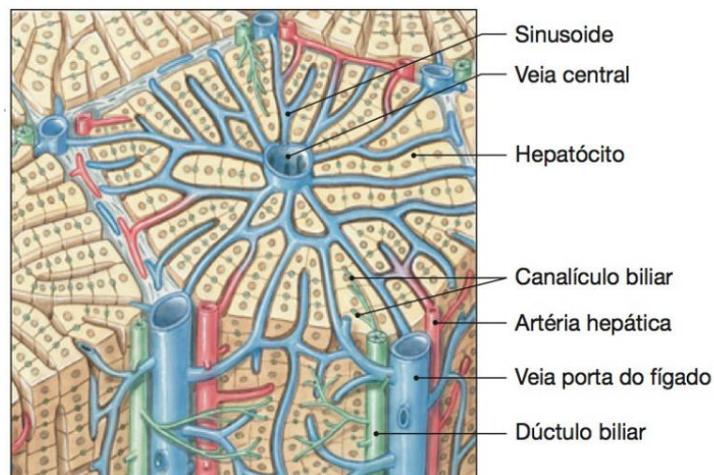


Figura 1: Estrutura vascular do parênquima hepático  
Fonte: Adaptado: (Barrett, 2014)

O parênquima hepático é composto por hepatócitos, células endoteliais, células de Kupffer e células estreladas hepáticas (CEH) (Figura 2).

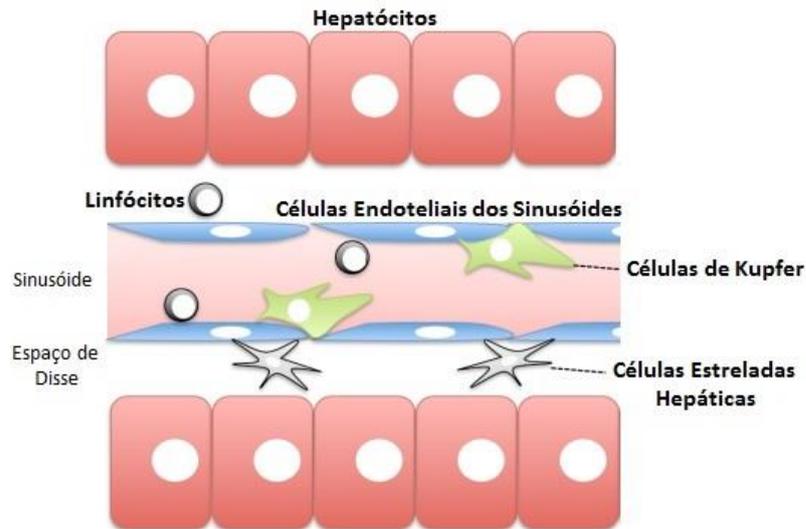


Figura 2: Principais células do parênquima hepático  
 Fonte: Adaptado (Barrett, 2014)

Os hepatócitos representam 80% das células hepáticas e são responsáveis pela maior parte das funções características do fígado. Essas células se justapõem e formam as unidades morfológicas do fígado, os lóbulos hepáticos (Barret, K. E., 2009).

As células endoteliais fenestradas presentes no parênquima hepático formam os sinusóides hepáticos. Esse sinusóides recebem o suprimento sanguíneo, distribuindo-o para os hepatócitos e mantem o fluxo nutricional do fígado (Barrett, 2014). Interpostas, em meio às células endoteliais, as células de Kupfer atuam como defensoras do tecido hepático devido suas propriedades macrofágicas. Sua localização permite que essas células entrem em contato com partículas tóxicas, removendo-as e evitando danos ao tecido hepático (Barrett, 2014).

O espaço de Disse que está situado entre a superfície dos hepatócitos e os sinusóides contém uma camada de tecido conectivo frouxo onde as CEH são encontradas. Essas células normalmente armazenam gotículas lipídicas que contém vitamina A e participam do metabolismo retinóico. Em condições patológicas crônicas, as CEH sofrem transformações fenotípicas e secretam quantidades crescentes de matriz extracelular (MEC) no espaço de Disse (Friedman, 2008).

## 2.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular (CHC) representa o tipo histológico mais comum de câncer primário de fígado que atualmente configura-se como o quinto câncer mais prevalente no mundo e a terceira principal causa de morte relacionada ao câncer. Essa neoplasia está associada à segunda menor taxa de sobrevivência em 5 anos de todos os tipos de tumores e sua incidência vem crescendo mundialmente (Lafaro *et al.*, 2015; Llovet *et al.*, 2012).

Cerca de 80% dos casos de CHC estão localizados na África Subsaariana e na Ásia Oriental, enquanto comparativamente, o continente Americano e a Europa possuem baixa incidência (Weledji *et al.*, 2014). Entretanto, existe uma tendência ao aumento de casos de CHC em áreas com incidência tradicionalmente baixa, devido ao crescente aumento de fatores de riscos metabólicos e mudanças nos perfis epidemiológicos (Wallace *et al.*, 2015).

No Brasil, dois grandes estudos feitos em 1997 e 2009, demonstraram que a etiologia, o diagnóstico e o tratamento do CHC são muito diferentes nas cinco regiões brasileiras (Kikuchi *et al.*, 2013). A grande extensão e diversidade em muitos aspectos do país contribuem para que grande parte dos dados epidemiológicos brasileiros continuem escassos na literatura.

A cirrose configura 90% dos casos mundiais como a principal causa precursora para o desenvolvimento do CHC (Bruix *et al.*, 2014). Diversos fatores de risco iniciam e promovem o estabelecimento de lesões crônicas no tecido hepático: hepatites causadas pelo vírus B e C, consumo excessivo do álcool, síndromes metabólicas, doenças hepáticas não alcoólicas, fatores hereditários, entre outros (Figura 3) (Lafaro *et al.*, 2015).

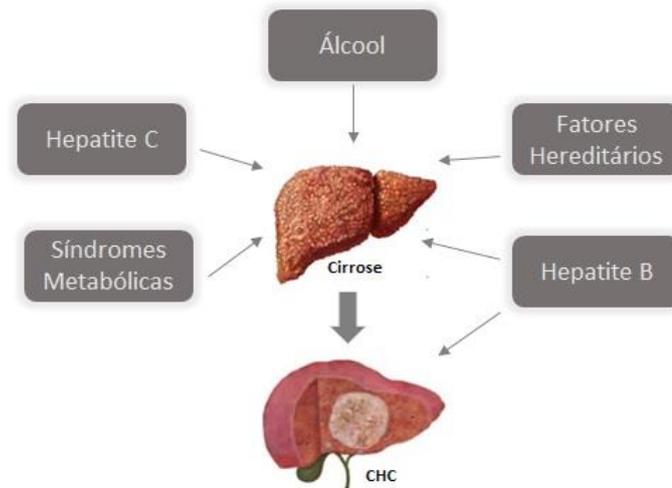


Figura 3: Fatores de risco associados ao CHC  
 Fonte: Adaptado de (Lafaro *et al.*, 2015)

A gravidade do CHC pode ser correlacionada com os fatores que predizem a cirrose, uma vez que quanto maior o dano nos hepatócitos, maior chance de nódulos cancerosos estarem presentes no tecido hepático (Bruix *et al.*, 2014). Por meio do rastreamento de pacientes predisponentes é possível que ocorra um diagnóstico precoce, bem como o uso de terapêutica eficaz.

A grande maioria dos casos de CHC é diagnosticada quando o tumor se apresenta avançado e com pouca possibilidade de cura. Existem inúmeras terapias (resseção cirúrgica, radiofrequência, ablação química, sorafenib e o transplante hepático) que são utilizadas na prática clínica, porém o CHC continua sendo um desafio para medicina atual. Essa doença envolve diferentes estágios que apresentam eventos moleculares que interagem entre si criando ambiente favorável à iniciação, promoção e progressão do tumor (Liccioni *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Carcinogênese hepática

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos nesse processo complexo que é carcinogênese hepática. A etiologia do CHC é muito variada e por isso, o parênquima hepático responde a essas comorbidades de forma distinta. Esse processo envolve a transformação gradual de células normais em malignas via populações de células intermediárias e na maioria dos casos inicia-se com uma lesão persistente no tecido que irá gerar uma inflamação hepática crônica (Figura 4) (Ding e Wang, 2014).

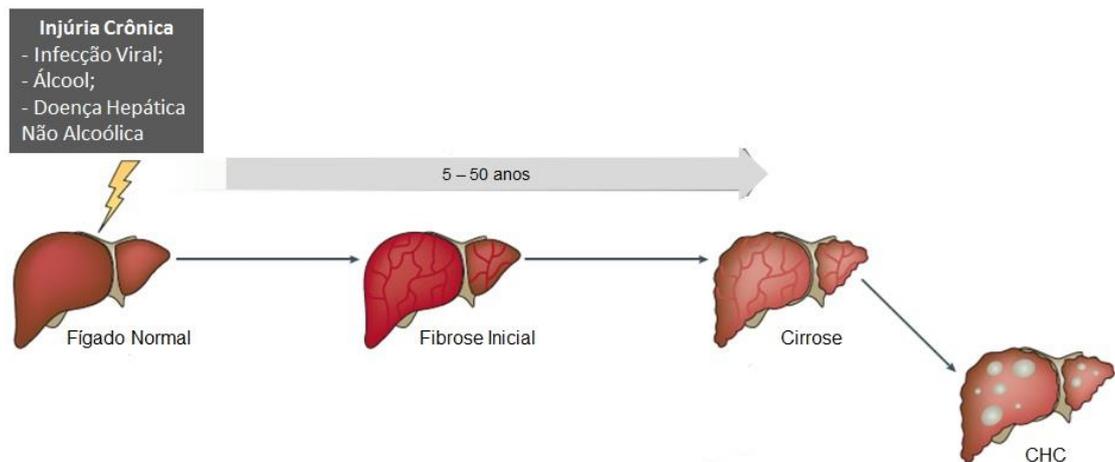


Figura 4: Carcinogênese hepática  
 Fonte: Adaptado (Pellicoro *et al.*, 2014)

A inflamação hepática crônica provoca dano tecidual sustentado e permite que as neoplasias incipientes adquiram capacidade de iniciação tumoral. Por meio da ativação de células inflamatórias envolvidas nesse processo patológico, moléculas bioativas como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) são produzidas e estão relacionadas ao ambiente inflamatório característico que propicia a carcinogênese. Aliado a isso, o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN), nesse ambiente, pode provocar alterações irreversíveis no DNA dos hepatócitos, gerando o acúmulo de mutações celulares e contribuindo para a tumorigênese (Hernandez-Gea *et al.*, 2013).

A inflamação crônica persistente propicia uma resposta fibrótica do parênquima hepático caracterizada pela deposição progressiva de MEC, decorrente da ativação das CEH que se transdiferenciam em miofibroblastos e se tornam células altamente proliferativas capazes de sintetizar e depositar proteínas fibrinogênicas, como o colágeno tipo I (Figura 5) (Friedman, 2008; Elpek, 2014).

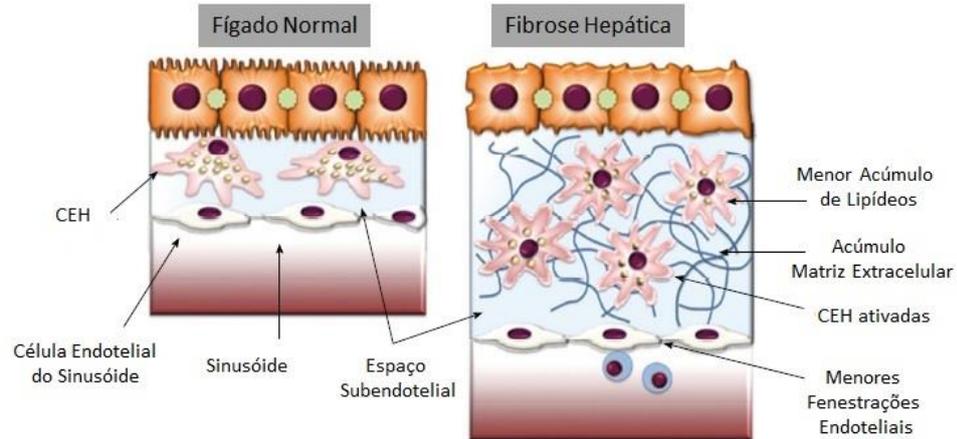


Figura 5: Comparação entre fígado normal e fígado cirrótico  
 Fonte: Adaptado (Elpek, 2014)

A progressão da fibrose, resultado da necrose, da inflamação crônica e da regeneração dos hepatócitos, propicia a desarquiteturação do parênquima hepático. Associado a isso ocorre a formação de nódulos, a disfunção hepatocitária e o desenvolvimento de hipertensão portal que são base para o estabelecimento do quadro clínico de cirrose (Yeom *et al.*, 2015). Segundo Vezozzo e Carilho (2014), por ser a principal causa de CHC, pacientes cirróticos devem ser avaliados a cada seis meses a fim de se diagnosticar precocemente o CHC.

### 2.2.2 Modelos experimentais em CHC

Modelos experimentais de doenças hepáticas crônicas utilizando roedores são, atualmente, o padrão áureo para compreender e confirmar aspectos moleculares da doença. Estabelecer modelos animais de CHC é essencial para compreender a biologia do tumor, o processo de carcinogênese e suas interações com o tecido hepático e principalmente para testar novos fármacos na prevenção e no desenvolvimento desse tipo câncer (Liedtke *et al.*, 2013).

Existem diversos modelos experimentais em CHC: os modelos por indução química, por xenoenxerto, modelos virais, modelos com modificação genética de vias ou proteínas específicas, entre outros. Nenhum modelo é ideal para todos os fins, cada um deles tem propriedades que darão ao pesquisador a oportunidade de avaliar características do CHC que se desenvolveram a partir do modelo escolhido. Não é incomum encontrarmos na literatura a associação de dois ou mais tipos de

modelos para a indução do CHC, justamente devido a dificuldade de um único modelo mimetizar as características da neoplasia hepática (Bakiri e Wagner, 2013).

Os modelos de CHC por indução química são os que mais se assemelham às etapas da carcinogênese humana. Esses modelos envolvem muitas vezes substâncias cancerígenas indutoras, como a tiocetamida (TAA), o DEN e o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) associada a outra substância promotora, como o fenobarbital e o 2-AAF ou até mesmo à hepatectomia (Heindryckx *et al.*, 2009)

DEN é um potente hepatocarcinogênico encontrado na fumaça do tabaco e em produtos químicos agrícolas. No fígado essa substância é metabolizada no citocromo P450 e gera ERO que podem lesar proteínas e lipídeos, bem como afetar o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos hepatócitos. Além disso, o DEN é um potente alquilante do DNA e provoca alterações genéticas profundas nas células hepáticas (Fausto e Campbell, 2010).

Diversos protocolos experimentais foram descritos na literatura utilizando DEN e grande parte deles, à semelhança do que ocorre com os pacientes com CHC, desenvolvem uma sequência de múltiplos estágios que promovem a transformação do tecido hepático normal em neoplasias malignas (Sivaramakrishnan *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2015).

### 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio (O<sub>2</sub>) é um importante gás presente na nossa atmosfera e essencial para a vida dos organismos aeróbicos. O processo de respiração desses organismos acontece fundamentalmente na mitocôndria, onde a cadeia transportadora de elétrons doa quatro elétrons ao O<sub>2</sub> formando adenosina trifosfato (ATP) e liberando água (H<sub>2</sub>O) e gás carbônico. Entretanto, cerca de 2 a 5% do O<sub>2</sub> que respiramos tem forte tendência a sofrer redução monoelétrica, ou seja, receber apenas um elétron de cada vez. Esse comportamento gera intermediários reativos e tóxicos ao nosso organismo, as ERO (Davies, 1995).

As ERO formadas a partir das reduções monoelétricas do O<sub>2</sub> são o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o radical hidroxil (<sup>•</sup>OH) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figura 6).

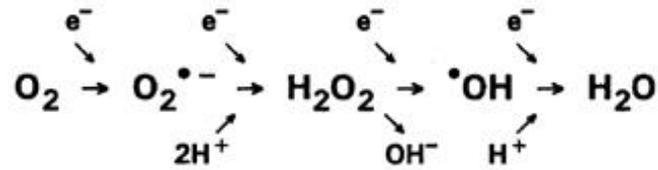


Figura 6: Redução do oxigênio molecular e formação de ERO  
Fonte: (Davies, 1995).

Radicais livres (RL) podem ser definidos como qualquer espécie química que possui elétrons desemparelhados em seus orbitais, geralmente, os mais externos. O radical hidroxil e o ânion radical superóxido são os dois principais RL formados por organismos aeróbios (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O radical superóxido é tipicamente a primeira ERO a ser formada no processo de redução monoeletrônica do  $\text{O}_2$ . Esse RL não consegue atravessar as membranas biológicas, mas pode sofrer o processo de dismutação sendo convertido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um potente difusor de membranas. O peróxido de hidrogênio é uma molécula estável muito permeável às membranas celulares e não apresenta toxicidade às células em condições fisiológicas (Djordjević, 2004).

O radical hidroxil é o RL mais danoso e é encontrado em baixas concentrações nos tecidos biológicos. Por ser altamente instável, atua principalmente oxidando moléculas protéicas, principalmente aquelas que contêm grupos sulfidrilas, além de oxidar lipídeos e modificar as bases purínicas e pirimidínicas do DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007). Esse radical pode ser formado por meio da interação do peróxido de hidrogênio com íons de ferro e/ou cobre (Reação de Fenton) e quando há a interação entre o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido na presença de metais em transição (Reação de Haber–Weiss) (Morgan-Martins, 2012) (Figura 7)

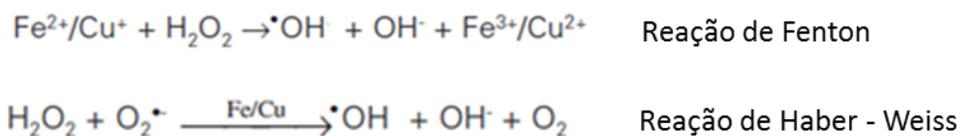


Figura 7: Reação de Fenton e Reação de Haber–Weiss  
Fonte: Adaptado (Halliwell e Gutteridge, 2007)

Estresse oxidativo (EO) é o fenômeno que pode ser caracterizado pela superprodução prolongada da ERO, desencadeando desequilíbrio a favor dos agentes oxidantes. Esse desequilíbrio afeta diversas estruturas celulares essenciais ao funcionamento da célula, como as membranas celulares, as proteínas e as bases nitrogenadas do DNA. Por isso, o EO é relacionado com uma variedade de doenças (Halliwell, 2007).

As membranas celulares são estruturas susceptíveis aos danos causados pelo EO. Por serem compostas majoritariamente por lipídeos, essas membranas acabam sofrendo lipoperoxidação (LPO), comprometendo a sua estrutura e função, além de expor o conteúdo citoplasmático da célula no líquido intersticial (Morgan-Martins, 2012).

O efeito genotóxico de altas concentrações de ERO é o primeiro evento ligado ao processo de iniciação do tumor. Diretamente, o  $\cdot\text{OH}$  produzido a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pode causar quebras na cadeia dupla e modificações nas bases e ligações cruzadas do DNA gerando, conseqüentemente, alterações na informação genômica através de mutações pontuais, deleções, inserções ou translocações cromossômicas (Gupta *et al.*, 2012).

Durante a fase de promoção, aliado à instabilidade genômica, as células iniciadas apresentam EO persistente que contribui para a expressão anormal de genes e alteração na comunicação célula-célula. Além disso, segundos mensageiros de vias de sinalização específicas são modificados resultando no aumento da proliferação e/ou diminuição da taxa de apoptose dessas células (Klaunig *et al.*, 1998).

Por fim, além de criar esse ambiente favorável ao processo de carcinogênese, as ERO podem ativar vias específicas de sinalização que regulam crescimento e a angiogênese tumoral permitindo assim, a progressão do câncer no organismo (Ushio-Fukai e Nakamura, 2008; Reuter *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Defesas antioxidantes

Os efeitos deletérios causados por ERO podem ser combatidos por sistemas de defesa antioxidante. Os antioxidantes (AOX) compreendem substâncias que em baixas concentrações retardam ou inibem a oxidação de moléculas (Halliwell e

Gutteridge, 2007). Eles podem ser classificados dois grandes grupos: as defesas antioxidantes enzimáticas e as não enzimáticas.

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). A SOD é a enzima catalisadora da dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  e o produto dessa reação ( $H_2O_2$ ) é rapidamente removido e transformado em  $H_2O$  e oxigênio pela CAT e/ou pela GPx. Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam que ocorra a produção de  $\cdot OH$ , o radical mais danoso que não possui sistema enzimático próprio que o degrade (Brieger *et al.*, 2012).

A família das glutathionas-s-transferases (GST) são, também, enzimas bastante importantes para o sistema enzimático de defesa antioxidante. A GST possui diversas isoformas e está diretamente ligada a detoxificação de compostos tóxicos as células (xenobióticos). Essa enzima participa ativamente da fase II do processo de desintoxicação, biotransformando os xenobióticos, facilitando assim sua excreção (Board e Menon, 2013) (Figura 8).

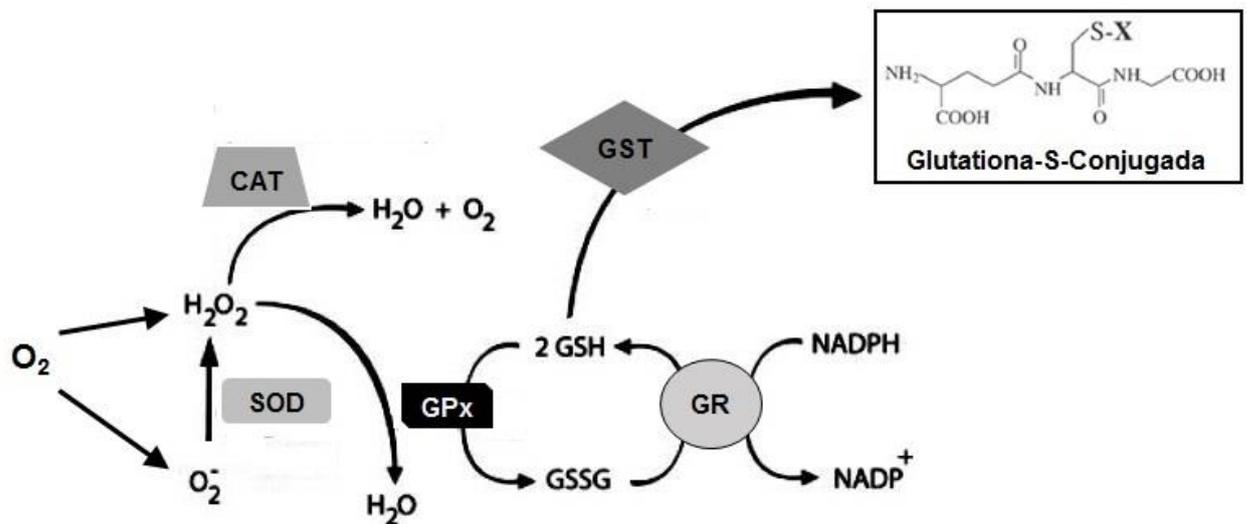


Figura 8: Ação das enzimas antioxidantes  
Fonte: Adaptado (Schemitt, 2014)

O sistema de defesa antioxidante não enzimático é composto principalmente por substâncias presentes nas células, como a glutathione (GSH). A maior parte da ação AOX desse tripetídeo ocorre por meio da sua utilização como substrato pela GPx. Esta enzima catalisa a redução de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  gerando a glutathione oxidada (GSSG), um composto potencialmente tóxico para as células, mas que rapidamente é convertido a GSH pela enzima glutathione reduzida (GR). Enquanto a GSH é o AOX

mais importante produzido nas células, existem outros antioxidantes não enzimáticos que podem ser obtidos a partir da dieta, tais como as vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol) e C (ácido ascórbico), carotenoides e polifenóis (Morgan-Martins, 2012).

## 2.4 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é um processo fisiológico caracterizado pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (Folkman, 2007). A reprodução, desenvolvimento e reparação de tecidos são alguns exemplos relacionadas a esse processo que depende de uma variedade de proteínas inibidoras e ativadoras. Inicialmente o aumento da proliferação das células endoteliais vasculares e conseqüentemente a degradação da sua membrana basal desencadeia a formação de novos vasos. Por meio da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, um microambiente favorável se estabelece e ocorre a migração das células endoteliais. Por fim, esse novos vasos sanguíneos passarão por um processo de maturação e estabilização (Figura 9) (Kalluri, 2003)

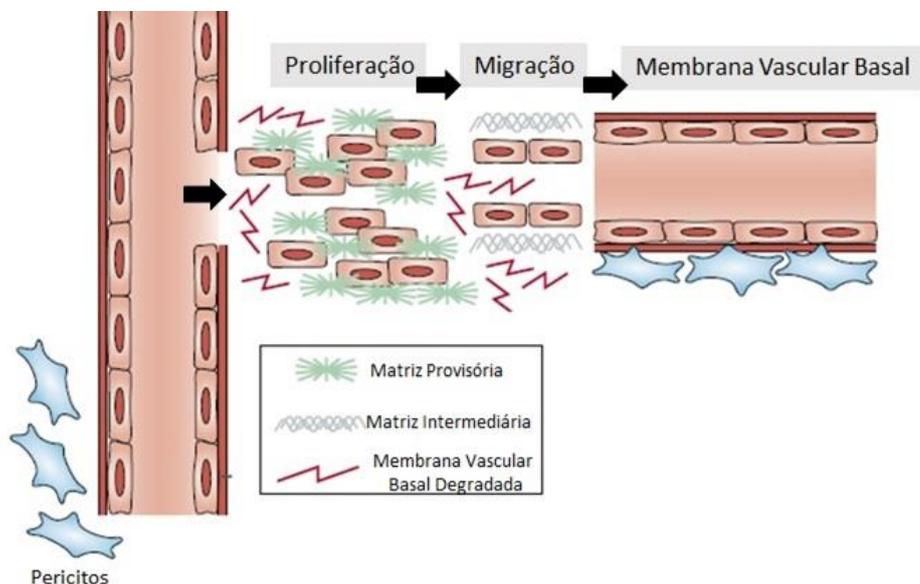


Figura 9: Angiogênese fisiológica  
Fonte: Adaptado: (Kalluri, 2003)

Entretanto, ao longo dos últimos anos, a angiogênese vem sendo investigada como um dos principais eventos fisiopatológicos no desenvolvimento e progressão do câncer (Folkman, 1971; Hanahan e Weinberg, 2011).

Nesse caso, diferentemente do processo fisiológico, os novos vasos serão rapidamente formados e serão responsáveis por sustentar e manter as características patológicas do tumor, além de mediar a disseminação de células tumorais para o resto do organismo. A angiogênese tumoral depende de uma série de fatores angiogênicos que serão secretados pelas células tumorais. Esses fatores incluem tanto os que regulam a destruição e manutenção da MEC, como aqueles que estimularão a migração das células endoteliais (Figura 10) (Wang *et al.*, 2015).

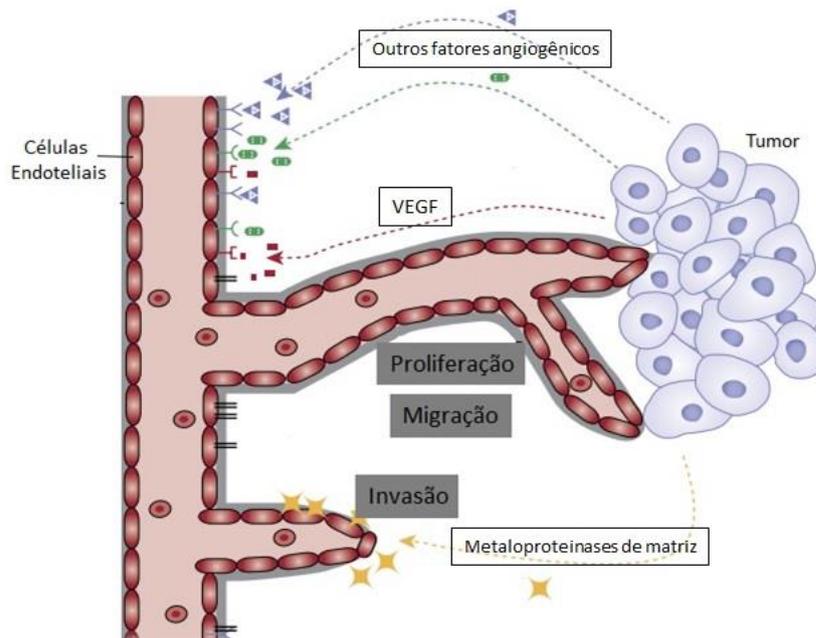


Figura 10: Angiogênese tumoral  
Fonte: Adaptado (Vrancken *et al.*, 2012)

#### 2.4.1 O fator de crescimento vascular endotelial e a via de sinalização da proteína quinase Akt

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma glicoproteína identificada pela primeira vez como um fator que aumentava a permeabilidade vascular nas veias da cavidade peritoneal de mamíferos com tumores ascíticos (Delli Carpini *et al.*, 2010). Pertencente a família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas, o VEGF atua sobre a angiogênese fisiológica e patológica e pode ser classificado em cinco diferentes subtipos. Sua ação é mediada por receptores de membrana tirosina quinase encontrados em células endoteliais: o VEGFR-1 e VEGFR-2 (Bry *et al.*, 2014).

Durante a carcinogênese, eventos sinalizadores como inflamação, hipóxia e transcrição de oncogenes favorecem o período conhecido como “gatilho angiogênico” (*angiogenic switch*). Esse período marca a intensa produção de fatores angiogênicos, em especial o VEGF, responsável pela ativação da proliferação e migração das células endoteliais e por induzir a vasodilatação e a permeabilidade vascular (Benazzi *et al.*, 2014). Diversos estudos têm relatado que o VEGF, por ter papel central no desenvolvimento de vasos anômalos, é essencial para a progressão de tumores, desenvolvimento de metástase e pior prognóstico em pacientes com câncer (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013).

A capacidade do VEGF de aumentar a permeabilidade vascular é uma das suas propriedades mais importantes, pois isso permite que diversas proteínas plasmáticas saiam para o estroma e o transformem em um ambiente pró-angiogênico propício (Hicklin e Ellis, 2005). Os mecanismos moleculares precisos pelos quais o VEGF induz esses efeitos não foram totalmente esclarecidos, porém estudos sugerem que o aumento da permeabilidade pode ser mediado via proteína Akt. A fosforilação dessa proteína ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que conseqüentemente aumenta a produção de óxido nítrico (NO) (Figura 11) (Roy *et al.*, 2006; Piguet e Dufour, 2011).

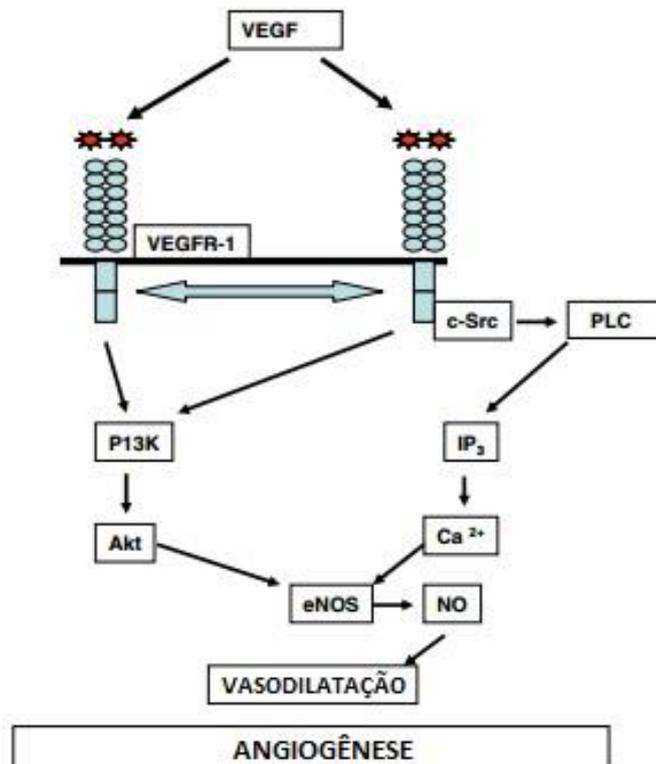


Figura 11: Via de ativação da proteína Akt na angiogênese.  
Fonte: Adaptado (Roy *et al.*, 2006).

O NO é um gás que atua como mediador de diversos processos intra e extracelulares. Dentre eles, fenômenos como inibição da adesão, ativação e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, potencialização da transmissão sináptica a longo prazo, entre outros. Além disso, o NO é responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica e patológica, como no caso dos tumores (Cerqueira e Yoshida, 2002).

A produção de NO é principalmente gerada por meio da óxido nítrico sintase (NOS). Essa enzima catalisa a oxidação de nitrogênio guanidino da L-arginina que é convertida em L-citrulina (Figura 12) (Zhao *et al.*, 2015).

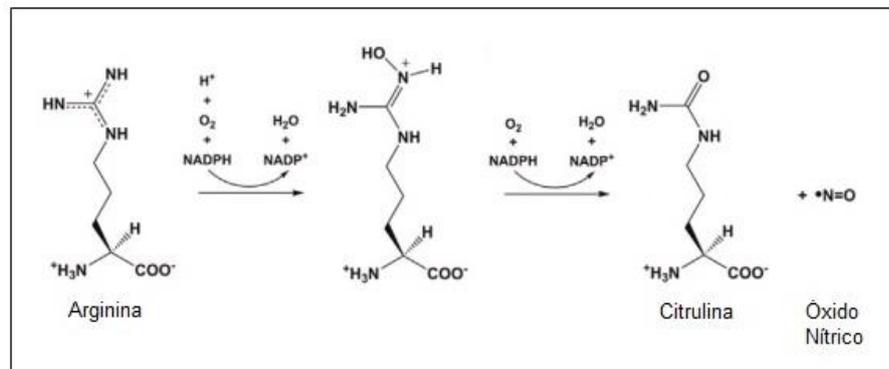


Figura 12: Reação que promove a produção de NO  
Fonte: Adaptado (Zhao *et al.*, 2015)

Diferentes isoformas de NOS foram descritas e agrupadas em dois grupos distintos: as NOS constitutivas (cNOS) e a NOS induzível (iNOS). Esses grupos diferem em seu peso molecular, forma de ativação e principalmente na capacidade de síntese de NO. As formas constitutivas compreendem a NOS neuronal (nNOS), presente nos neurônios e a eNOS presente em células endoteliais e plaquetas. Enquanto a forma induzível (iNOS) é expressa somente quando macrófagos e outras células do sistema imune são ativadas por citocinas (Dusse *et al.*, 2003).

## 2.5 MELATONINA

Ao final da década de cinquenta, Aaron B. Lerner e seus colaboradores (Lerner *et al.*, 1958) isolaram pela primeira vez uma molécula derivada da serotonina da glândula pineal de bovinos. Essa molécula, foi caracterizada e posteriormente

sua estrutura foi identificada, sendo conhecida como melatonina (Mel) (Figura 13) (Reiter et al., 2014).

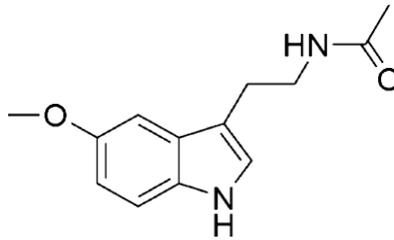


Figura 13: Estrutura molecular da melatonina  
Fonte: Galano *et al.*, 2011

A Mel é a principal molécula secretada pela glândula pineal em animais e é produzida ritimicamente nos pinealócitos durante o período escuro, sendo inibida durante a fase clara. O triptofano que é captado pela circulação é o composto precursor para a biossíntese da Mel. A enzima triptofano hidroxilase converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano que por ação da 5-triptofano descarboxilase é convertida em serotonina. Durante a fase de escuro a serotonina é catalisada formando de N-acetilserotonina que originará como produto final a Mel (Reiter *et al.*, 2013) (Figura 14).

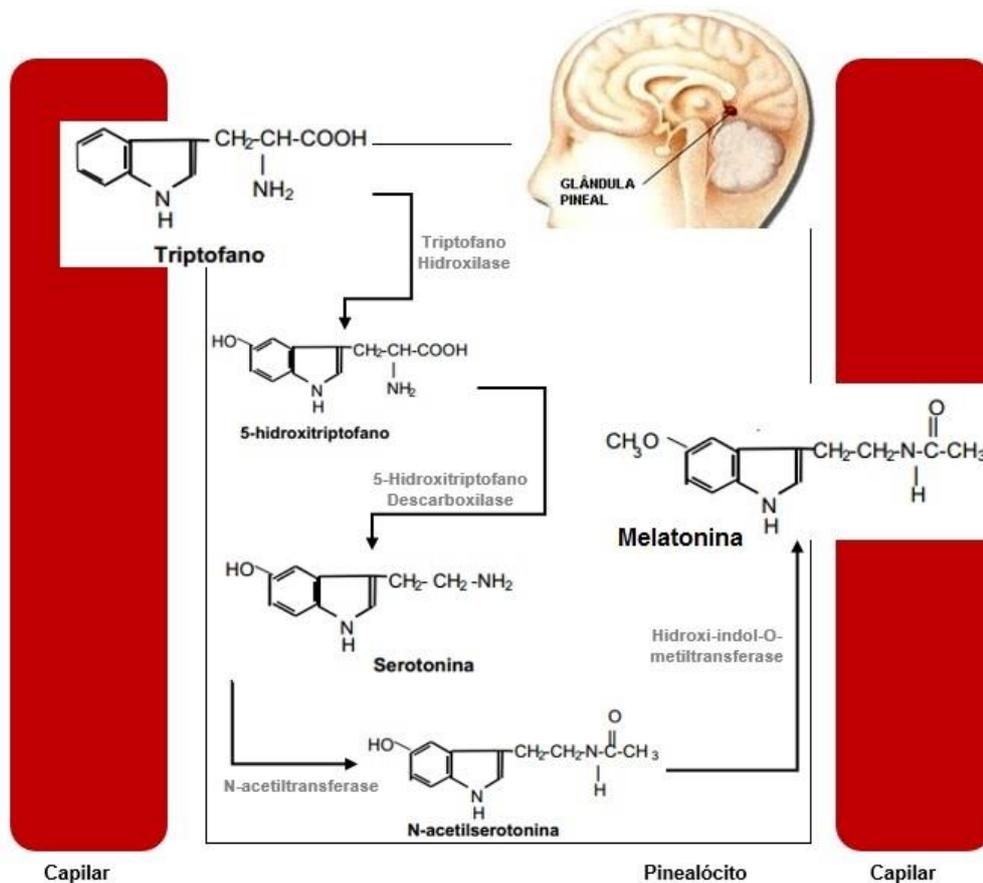


Figura 14: Biossíntese da Melatonina  
Fonte: Autora

A principal ação da Mel é sobre a regulação do ritmo circadiano em resposta a variação fotoperiódica. Porém, atualmente, sabe-se que essa molécula possui receptores em vários tecidos do organismo e por isso exibe uma notável versatilidade funcional sobre os sistemas neural, imunológico e endócrino (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014; Reiter *et al.*, 2014). Essa versatilidade pode ser explicada por meio das características estruturais da molécula. Seu caráter tanto hidrofílico quanto lipofílico permite que a Mel atravesse as membranas biológicas com extrema facilidade, além de estar presente em diversos fluídos biológicos, como o sangue, líquido cefalorraquidiano e a bile (Reiter *et al.*, 2014)

Diversos estudos identificaram uma potente ação AOX da Mel (Rosa *et al.*, 2010; Bona, 2014; Colares *et al.*, 2016) Essa ação ocorre devido, principalmente, a sua estrutura molecular que possui sítios doadores de elétrons e também pela sua capacidade de modular a expressão e atividade de enzimas antioxidantes (Galano *et al.*, 2011).

A Mel vem sendo descrita por apresentar propriedades oncostáticas em diversos tipos de câncer. Esse papel anti-tumoral ocorre por diferentes vias moleculares que estão associadas à atividade antioxidante: regulação da apoptose, sinalização de sobrevivência e metabolismo tumoral, inibição da angiogênese, invasão e metástase e indução de alterações epigenéticas (Li *et al.*, 2017; Reiter *et al.*, 2017).

Ao inibir a angiogênese tumoral a Mel tornou-se um importante agente na supressão tumoral. Estudos experimentais em CHC identificaram que essa molécula foi capaz de inibir algumas das principais vias moleculares que induzem a angiogênese, sendo uma molécula promissora para o uso na terapia do câncer (Alvarez-García *et al.*, 2013; Abdel-Mawla *et al.*, 2013; Carbajo-Pescador *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2016).

Tendo em vista esses estudos nos propusemos a avaliar o papel da Mel sobre os marcadores de estresse oxidativo e angiogênicos em ratos Wistar submetidos a um protocolo experimental de carcinogênese hepática.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da melatonina sobre marcadores de estresse oxidativo e angiogênicos no tecido hepático de ratos Wistar no modelo experimental de carcinogênese hepática induzido por dietilnitrosamina associado ao acetilaminofluoreno.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o peso e relação hepatossomática dos animais dos diferentes grupos em estudo;
2. Avaliar a integridade hepática por meio das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) nos grupos experimentais;
3. Avaliar as alterações histológicas e a fibrogênese do tecido hepático dos diferentes grupos em estudo;
4. Avaliar a lipoperoxidação, por meio o método de TBARS, no fígado dos animais dos grupos experimentais;
5. Determinar no tecido hepático dos grupos experimentais a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e GST;
6. Determinar os níveis de GSH no fígado dos animais dos grupos experimentais;
7. Avaliar mediante a análise por Western Blot, a expressão das proteínas VEGF, PI3K, p-Akt e eNOS no tecido hepático dos grupos experimentais;
8. Determinar os metabólitos do óxido nítrico no tecido hepático dos diferentes grupos em estudo, utilizando a técnica de nitritos e nitratos;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 4.1.1 Animais

Para o estudo foram utilizados 32 ratos machos Wistar, em torno de 1 mês de idade, com peso médio de 150 gramas. Esses animais permaneceram durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA - HCPA) e foram alocados em caixas plásticas forradas com maravalha (4 animais por caixa), em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C, recebendo alimentação e água livremente.

#### 4.1.2 Considerações Bioéticas

Os procedimentos com os animais estavam de acordo com o preconizado pela Legislação Brasileira que rege o uso científico de Animais (Lei Federal nº 11.794/08) (Brasil, 8 de outubro de 2008) e pelas diretrizes 13, 30 e 33 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa no Uso de Animais do HCPA (CEUA/HCPA) (número 14-0311).

#### 4.1.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais com oito animais em cada grupo:

- **Controle (CO)** – animais submetidos à administração intraperitoneal (i.p) de solução fisiológica (NaCl);
- **Controle + Melatonina (CO+Mel)** - animais submetidos à administração i.p de NaCl e tratados com Mel a partir da 12ª semana;
- **Carcinoma Hepatocelular (DEN)** – animais submetidos à administração i.p de DEN e 2-AFF;
- **Carcinoma Hepatocelular + Melatonina (DEN+Mel)** - animais submetidos à administração i.p de DEN e 2-AFF e a partir da 12ª semana tratados com Mel.

#### 4.1.4 Procedimentos experimentais

##### 4.1.4.1 Desenvolvimento do modelo de CHC

O modelo experimental teve duração de dezenove semanas e a indução química do CHC foi realizada por via i.p utilizando dois agentes carcinogênicos: DEN (SIGMA Chemical Co St Louis, USA) na dose de 50 mg/kg e 2-AAF (SIGMA Chemical Co St Louis, USA) na dose de 100 mg/kg (Moreira et al., 2015).

Nas três primeiras semanas e na quinta semana o DEN foi administrado aos animais duas vezes na semana. Já na quarta, sexta, décima primeira, décima segunda e décima terceira semana os animais foram submetidos a administração de DEN apenas uma vez na semana. Nas demais semanas a administração de DEN foi suspensa e uma única dose de 2-AAF foi aplicada na quarta semana (Figura 15) (Moreira et al., 2015).

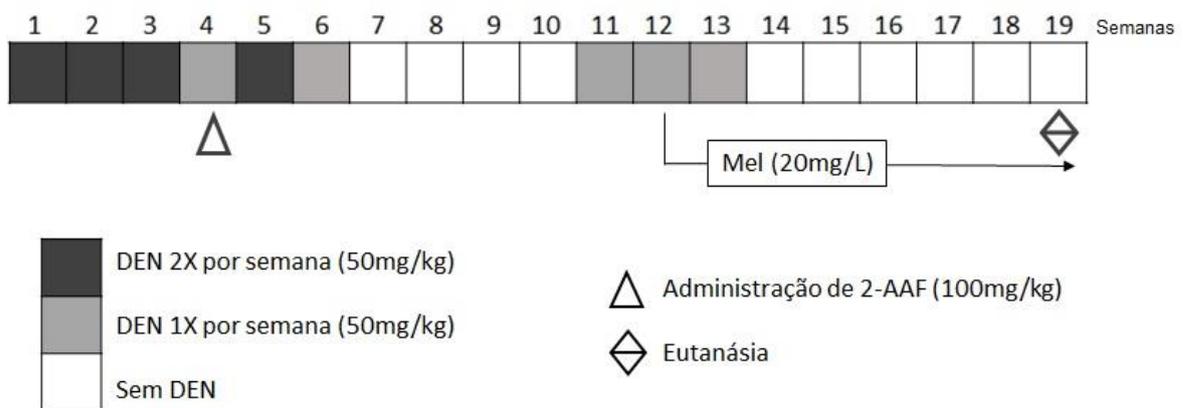


Figura 15: Delineamento Experimental  
Fonte: Adaptado (Moreira et al., 2015)

##### 4.1.4.2 Administração de Mel

A Mel (SIGMA Chemical Co St Louis, USA) utilizada neste projeto foi administrada na água de beber dos animais na concentração final de 20 mg/L (Molpeceres *et al.*, 2007). O tratamento teve início na décima segunda semana e manteve-se até o fim das 19 semanas de experimento. Esse tempo foi escolhido com base em estudo prévio que caracterizou a fase cirrótica na décima segunda semana de exposição ao DEN (Moreira et al., 2015). Para controlar o volume

ingerido, os animais foram colocados em caixas separadas (1 animal por caixa) e os volumes de água medidos a cada dois dias.

#### 4.1.4.3 Eutanásia e obtenção das amostras de sangue e de tecido

Transcorridas as 19 semanas de experimento, todos os animais foram anestesiados mediante a administração de uma mistura de cloridrato de Xilazina 2% 50 mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100 mg/Kg de peso corporal i.p.

O sangue foi coletado por meio da técnica de punção do plexo venoso retro-orbital com tubo de capilar de vidro heparinizado e, posteriormente, foi acondicionado em frascos específicos. Por fim, realizou-se tricotomia manual da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, para a coleta dos fígados dos animais. Esses fígados, inicialmente, foram pesados para posteriormente ser determinada a relação hepatossomática (RH) (%):

$$RH = \frac{\text{Peso do fígado (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \times 100$$

Uma fração do fígado foi retirada e preservada (formalina tamponada a 10%) para as análises histológicas e o restante foi devidamente acondicionado e destinado para as demais análises.

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por exanguinação sob anestesia profunda e os seus corpos foram colocados em embalagens específicas de descarte e seguiram os protocolos de rotina para descarte biológico da Unidade de Experimentação Animal do HCPA.

#### 4.1.4.4 Biossegurança e descarte de resíduos

Devido a seu potencial carcinogênico as drogas DEN e 2-AAF foram manipuladas utilizando a capela com fluxo ligado, além do equipamento de proteção individual. Os frascos, luvas e demais materiais que foram contaminados por estas drogas foram devidamente descartados nos lixos de material químico/quimioterápico do HCPA, para posterior incineração.

Os resíduos provenientes dos reagentes utilizados nas técnicas foram devidamente armazenados em frascos específicos e destinados ao Setor de Higienização do HCPA responsável pelo procedimento correto de eliminação. Os demais resíduos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum.

## 4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue dos animais coletado foi destinado para a Central de Bioquímica do HCPA, onde os níveis séricos das enzimas AST, ALT, FA,  $\gamma$ -GT foram mensurados por meio método enzimático automatizado (sistema Siemens Advia 1800) e expressos em unidades por litro (U/L).

## 4.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

As amostras de fígado devidamente preservadas foram encaminhadas para a Serviço de Patologia Experimental do HCPA para a preparação das lâminas histológicas. Inicialmente o tecido hepático foi dissecado e incluído em blocos de parafina e esses blocos, posteriormente, foram cortados no micrótomo rotativo (Leitz® 1512). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes de Hematoxilina Eosina (HE) e *Picrosirius* intermediadas por banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Foi colocada a lamínula sobre a lâmina, utilizando Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas nos diferentes aumentos em microscópio binocular Nikon Labophot equipado com câmera digital para captura de imagens através do software Image-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

## 4.4 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.4.1 Preparação do Homogeneizado e dosagem de proteínas

Para homogeneizar o fígado, foi colocado 9 mL de tampão (cloreto de potássio (KCl) 1,15%) por grama de tecido e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF),

na concentração de 100 mM em isopropanol (10 µL/mL de KCl). A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax durante 1 minuto na temperatura de 0 a 2°C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada por 10 min a 3000 rotações por minuto (rpm). Desprezou-se o precipitado e o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer à temperatura de -80°C para posteriores dosagens (Llesuy *et al.*, 1985).

O método de Bradford foi utilizado para quantificação das proteínas no fígado dos animais. Esse método utiliza o *Coomassie Brilliant Blue*, um pigmento do tipo trifenilmetano aniônico, que se une de forma covalente aos resíduos de lisina das proteínas e produz uma coloração azulada. Utilizando leitor de microplaca, a 595 nm, as amostras foram quantificadas e o cálculo foi feito utilizando um fator de correção médio calculado a partir da curva de calibração construída por meio de uma solução padrão de albumina bovina (SIGMA Chemical Co St Louis, Mo) (Bradford, 1976).

#### 4.4.2 Determinação das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico

A LPO presente nas amostras de tecido hepático foi mensurada pelo método de TBARS. A técnica consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico (TBA) e consequente formação do produto de coloração rósea. O aparecimento da coloração ocorre devido a presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de fígado homogeneizadas foram misturadas ao ácido tricloroacético (TCA 10%) e ao TBA (0,67%), aquecidas em banho de água fervente e resfriadas em gelo. A seguir acrescentou-se álcool n-butílico para por fim ocorrer a centrifugação (10 minutos a 2000 rpm). O sobrenadante obtido foi transferido para microplaca de 96 poços para leitura a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína (Buege e Aust, 1978).

#### 4.4.3 Determinação da atividade da enzima Catalase

A enzima catalase catalisa a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Para determinar a atividade da enzima foi colocado em cubetas de quartzo o meio de

reação (solução reguladora de fosfato 50 mM pH 7), o homogeneizado e em seguida, adicionado  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 M. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 240 nm e a concentração foi expressa em pmol/mg de proteína (Boveris e Chance, 1973).

#### 4.4.4 Determinação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase

A enzima GPx atua sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando a GSH como doador de hidrogênios. A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo a velocidade de oxidação do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) na presença de GSH e de GR em uma reação. Para tal, em uma cubeta de quartzo foram colocados solução reguladora de fosfatos potássios (100 mM, pH 7,0), GSH (40mM), GR, NADPH (10mM) e azida sódica (20mM) para a inibição da atividade da catalase. As amostras foram lidas numa absorvância de 340 nm e a atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína (Flohé e Günzler, 1984).

#### 4.4.5 Determinação da atividade da enzima Glutathione S Transferase

Para essa técnica foi utilizado tampão fosfato de sódio (0,2 M), homogeneizado de fígado, GSH e clorodinitrobenzeno (CDNB) (20 mM) que foram adicionados em uma cubeta. Ao fim do procedimento, a leitura foi realizada a 340 nm em um espectrofotômetro e os valores obtidos foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína (Mannervik e Guthenberg, 1981).

#### 4.4.6 Determinação da Glutathione total

Para a quantificação intracelular de GSH no fígado foi realizado um homogeneizado específico de tecido hepático com ácido perclórico (2 mM) e ácido etilenodiamino (EDTA) (4 mM). Após a centrifugação (12 000 rpm a 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ), foi retirado o sobrenadante e acrescentado uma solução neutralizante (KOH 2 M e MOPS 0,3 M). Em uma cubeta foi adicionado tampão fosfato (300 mM), ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) diluído no tampão fosfato (300 mM) e o sobrenadante de fígado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína (Beutler *et al.*, 1963).

## 4.5 ANÁLISES POR WESTERN BLOT

### 4.5.1 Preparação dos extratos citoplasmáticos e quantificação de proteínas

O extrato citoplasmático utilizado para detecção da expressão das proteínas citoplasmáticas foi preparado a partir de uma porção de fígado, adicionado a um tampão hipotônico (HEPES 1 M; NaF 0,5M; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM; EDTA 0,5M; ácido etileno glicol tetraacético (EGTA) 100 mM; água; Igepal (NP-40); Ditiotretitol) e um inibidor de proteases. Em seguida, o tecido foi macerado com pistilo e o homogeneizado formado foi agitado em vórtex e centrifugado a 16.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi aliquotado para a quantificação das proteínas presentes na amostra.

A técnica de Bradford foi utilizada para a quantificação de proteínas presentes no homogeneizado, utilizando a albumina bovina como padrão (SIGMA Chemical Co St Louis, USA) (Bradford, 1976). Por fim, as amostras foram armazenadas a -80°C para as posteriores análises.

### 4.5.2 Análises da expressão das proteínas relacionadas a angiogênese tumoral

Para a análise dessa técnica o sistema descrito por Laemmli e colaboradores (1970) foi utilizado para a eletroforese, e para o Blot, a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979) (Laemmli *et al.*, 1970; Towbin *et al.*, 1979).

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% foi realizada utilizando um tampão de eletroforese (Tris 100 mM, glicina 190 mM, dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,4%; pH 8,3). Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Bradford, MA, USA), a fim de permitir a sua exposição aos anticorpos. Nesse processo de transferência, foi utilizado um tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM e metanol 20%) a 13 volts durante 30 minutos. Posteriormente as membranas foram colocadas na solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em TTBS (tampão fosfato salina-tris) contendo 0,1% Tween 20) durante 60 minutos, a 37° C. A membrana de PDVF foi, então, incubada em overnight a 4° C com anticorpos primários policlonais específicos: anti- VEGF (sc-7269) na diluição de 1:1000; anti- PI3K (sc-376112) na diluição de 1:1000; anti- p-AKT (sc-135650) na diluição de 1:500; anti - eNOS (sc-

8311) na diluição de 1:500 (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA) e anti B-actina (A 5060) na diluição 1:500 (Sigma Chemical CO<sup>®</sup>, USA), esse último utilizado para fins de cálculo. Todos os anticorpos foram diluídos com TTBS em 5% de leite desnatado.

Após esse período, a membrana foi lavada quatro vezes com TTBS e incubada durante uma hora com anticorpo específico anti-imunoglobulina de coelho ou rato. Transcorrido esse tempo, as proteínas foram detectadas mediante reagente quimiluminescente (Millipore, MA, USA) e a densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem (Image J, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (u. a.).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO é uma substância extremamente lábil, com meia vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma, a medida do NO é feita de forma indireta, através da medida de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Esse método consiste na redução enzimática de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  na presença de nitrato redutase e NADPH, e posterior reação dos nitritos formados (ou presentes inicialmente nas amostras) com o reagente de Griess (mistura de sulfanilamida e naftiletlenodiamina, específico para  $\text{NO}_2^-$ ). A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm e os resultados expressos em mmol de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  (Granger *et al.*, 1999).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para detectar diferenças com magnitude (tamanho de efeito: E/S) maior de que 2,5 unidades de desvio padrão, mantendo-se  $\alpha = 0,05$  e poder de 90% foram calculados oito (8) ratos por grupos (total de 32).

Os dados quantitativos gerados foram descritos por média e desvio padrão. A comparação dos grupos foi realizada por análise de variância *One-Way*. No caso de significância, o teste de Tukey foi aplicado e os dados analisados com o programa SPSS Statistics 18.0 foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ASPECTOS GERAIS DE PESO E RELAÇÃO HEPATOSSOMÁTICA

Ao longo do experimento, o peso (gramas) dos animais de todos os grupos em estudo foi mensurado. Verificou-se que houve diminuição significativa no peso final dos animais do grupo DEN e do grupo DEN+Mel em relação aos grupos controles. Além disso, a relação hepatossomática média (RH) de cada grupo experimental foi calculada utilizando o peso do fígado cada animal dividindo-o pelo seu respectivo peso corporal. Os valores foram expressos em porcentagem e pode-se observar que o grupo DEN teve aumento significativo da RH em relação aos grupos controles enquanto o grupo DEN+Mel teve diminuição significativa em relação ao grupo DEN (Tabela 1).

Tabela 1: Peso corporal médio (inicial e final) e a relação hepatossomática média (RH) dos animais dos diferentes grupos

	Grupos experimentais			
	CO	CO + Mel	DEN	DEN + Mel
<b>Peso inicial (g)</b>	158,5 ± 12,51	155,58 ± 13,05	141,94 ± 18,78	164,10 ± 11,28
<b>Peso final (g)</b>	491,06 ± 35,29	484,75 ± 12,12	293,16 ± 29,48 *	336,12 ± 14,58*
<b>RH (%)</b>	3,13 ± 0,17	3,12 ± 0,23	11,51 ± 7,57 *	4,17 ± 0,28 **

RH: relação hepatossomática. Valores expressos em média ± desvio padrão, sendo \*: diferença significativa em relação aos grupos CO e CO+Mel ( $p < 0,001$ ); \*\*: diferença significativa em relação ao grupo DEN ( $p < 0,05$ ). (Teste de Tuckey,  $n = 8$  animais/grupo).

### 5.2 ENZIMAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Para avaliar a integridade do fígado, foram mensurados os níveis séricos das transaminases (ALT e AST), da FA e da  $\gamma$ -GT. O grupo DEN teve aumento significativo nos valores dessas enzimas em relação aos grupos controles e o grupo DEN+Mel teve redução significativa da ALT e da  $\gamma$ -GT em relação ao grupo DEN (Tabela 2).

Tabela 2: Níveis séricos das enzimas de integridade hepática dos animais dos diferentes grupos

	Grupos experimentais			
	CO	CO + Mel	DEN	DEN + Mel
<b>AST</b> (u/l)	133,80 ± 11,73	124,20 ± 15,88	258,40 ± 89,77 *	138,20 ± 11,52 **
<b>ALT</b> (u/l)	67,00 ± 16,74	50,40 ± 8,82	130,20 ± 36,56 *	94,60 ± 8,73
<b>FA</b> (u/l)	135,00 ± 71,75	91,20 ± 31,24	275,20 ± 113,42 *	205,00 ± 26,15
<b>γ-GT</b> (u/l)	1,40 ± 0,89	2,00 ± 1,00	74,00 ± 48,85 *	31,20 ± 12,19 **

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; γ-GT: gama glutamil transferase. Valores expressos em média ± desvio padrão. sendo \*: diferença significativa em relação aos grupos CO e CO+Mel ( $p < 0,01$ ); \*\*: diferença estatística em relação ao grupo DEN ( $p < 0,05$ ). (Teste de Tuckey,  $n = 8$  animais/grupo).

### 5.3 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

#### 5.3.1 Avaliação por Hematoxilina Eosina

A histologia dos fígados foi realizada por meio da coloração hematoxilina-eosina (Figura 16). As Figuras 16A e B representam o parênquima hepático normal dos animais do grupo CO e CO+Mel, respectivamente. Na figura 16C, o parênquima hepático dos animais do grupo DEN é anormal, com padrão pseudotrabeccular (crescimento em cordões ou placas com espessura de duas ou mais células) e crescimento pseudoacinar (apresenta formação de espaços glanduliformes de células com aspecto de hepatócitos), evidenciando grandes nódulos. Além disso, existem alterações nucleares e citoplasmáticas nos hepatócitos, como o aumento da densidade celular e do índice mitótico caracterizando a presença de CHC. Na Figura 16D observa-se no parênquima hepático dos animais do grupo DEN+Mel a presença de nódulos regenerativos (NR) com displasia de baixo grau (nódulos com margens mal definidas com displasia de grandes e de pequenas células), lesões pré-cancerosas com fibrose e padrão cirrótico.

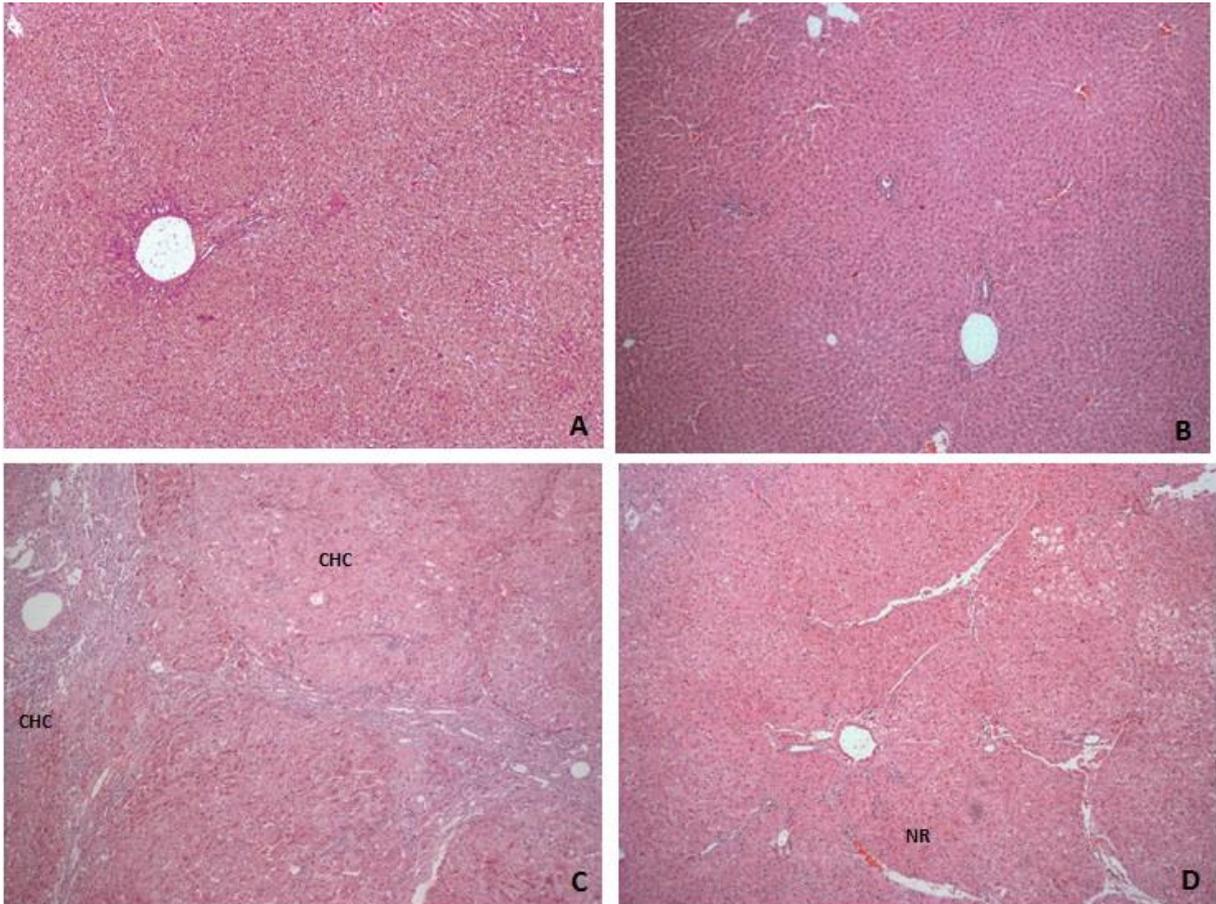


Figura 16: Fotomicrografias do fígado dos animais em estudo coradas com Hematoxilina Eosina (HE) em aumento (10x). (A) Grupo CO; (B) Grupo CO+Mel; (C) Grupo DEN e (D) Grupo DEN+Mel. Observa-se a presença de carcinoma hepatocelular (CHC) e de nódulos regenerativos (NR).

### 5.3.2 Avaliação por *Picrosirius*

A coloração de *picrosirius* foi utilizada para evidenciar a fibrose no tecido hepático dos grupos experimentais. As Figuras 17A e B representam o parênquima hepático normal, sem a presença de fibrose entre os hepatócitos, nos grupos CO e CO+Mel, respectivamente. A Figura 17C observa-se um intenso depósito de MEC, formando nódulos de colágeno espessos (representado pela seta) caracterizando fibrose intensa presente no tecido hepático do grupo DEN. Nos animais DEN+Mel constata-se que há depósito fibrótico no parênquima hepático, porém há uma redução significativa da fibrose com septos e nódulos fibróticos incompletos quando comparados ao grupo DEN (Figura 17D).

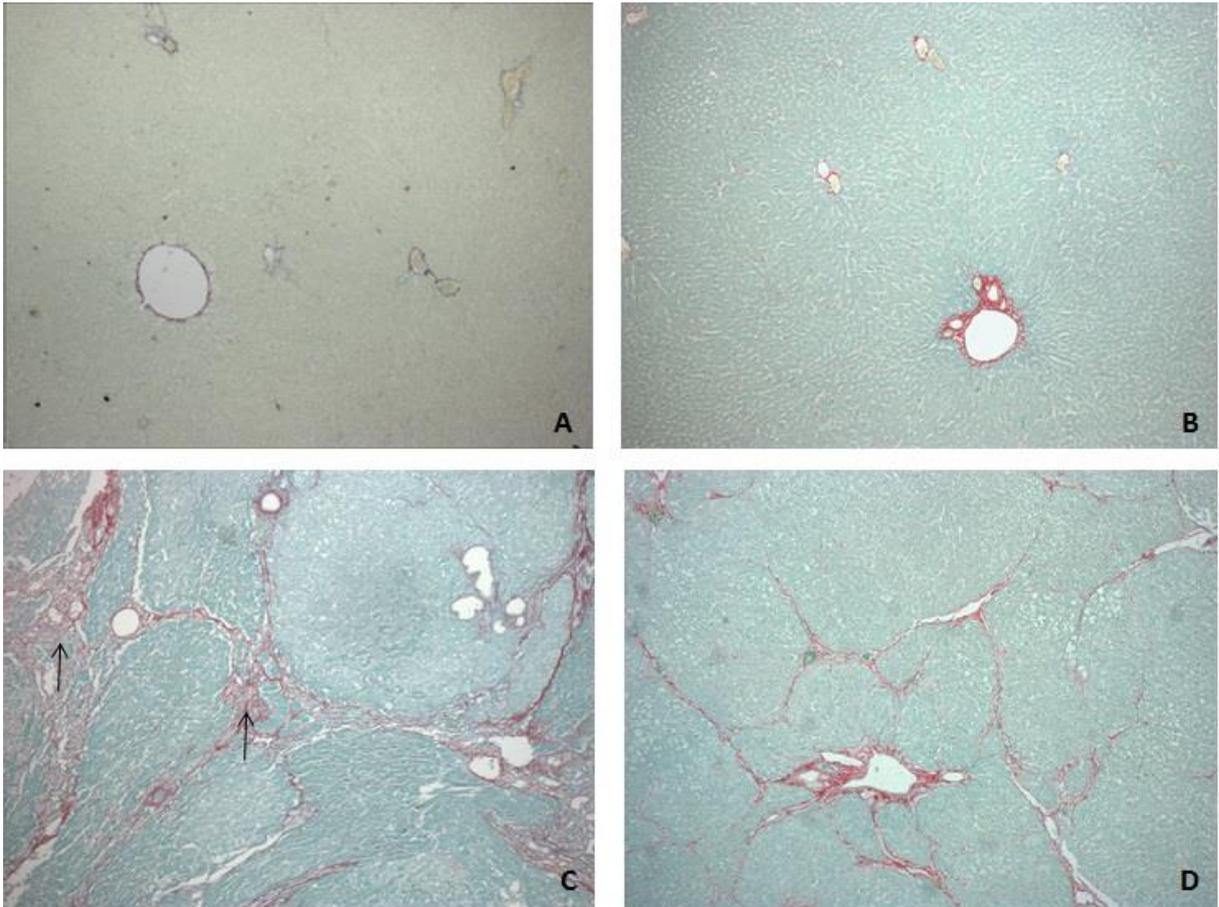


Figura 17: Fotomicrografias do fígado dos animais em estudo coradas com *Picrosirius* em aumento (10x). (A) Grupo CO; (B) Grupo CO + Mel; (C) Grupo DEN e (D) Grupo DEN + Mel. Observa-se a intensa deposição de matriz extracelular (seta).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Os valores de LPO no fígado dos animais do grupo DEN demonstraram um aumento significativo em relação os grupos controles. Os animais que foram tratados com Mel demonstraram redução significativa quando comparados ao grupo DEN (Figura 18).

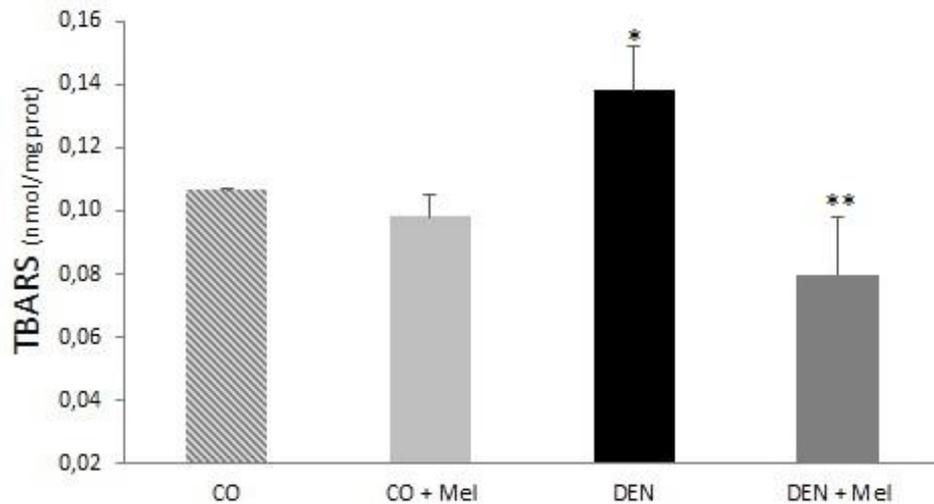


Figura 18: Efeito da administração de melatonina sobre os níveis de TBARS. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN em relação aos grupos CO e CO+Mel ( $p < 0,05$ ); \*\*: diferença significativa do grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN ( $p < 0,001$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA CATALASE

A atividade da enzima CAT no homogeneizado de fígado dos animais dos grupos em estudo é apresentada na Figura 19. Foi observada diminuição significativa nos animais do grupo DEN em relação ao grupo CO, enquanto aumento da atividade dessa enzima foi observado no grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN.

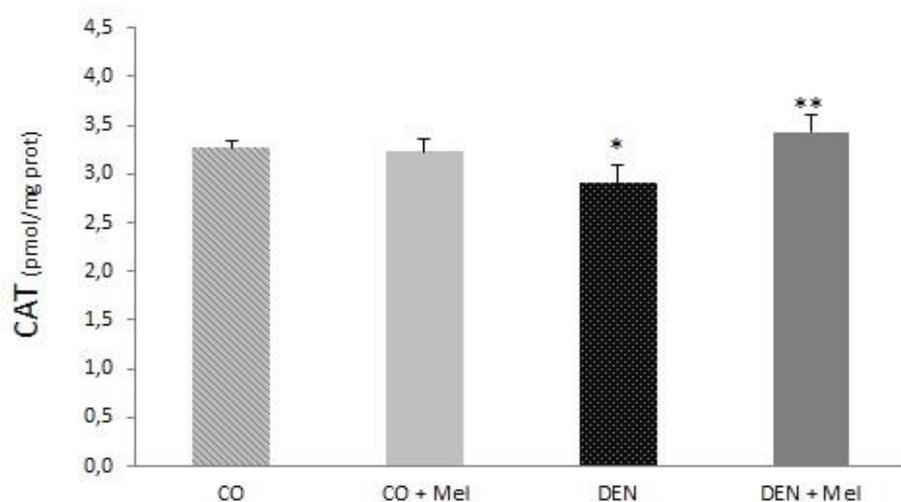


Figura 19: Efeito da administração de melatonina sobre a atividade da enzima CAT. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN em relação ao grupo CO ( $p < 0,01$ ). \*\*: diferença significativa do grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN ( $p < 0,001$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE

Na Figura 20, são apresentados os resultados da atividade da enzima GPx no homogeneizado de fígado dos animais dos grupos em estudo. Uma diminuição significativa foi observada nos animais dos grupos DEN e DEN+Mel em relação ao grupo CO.

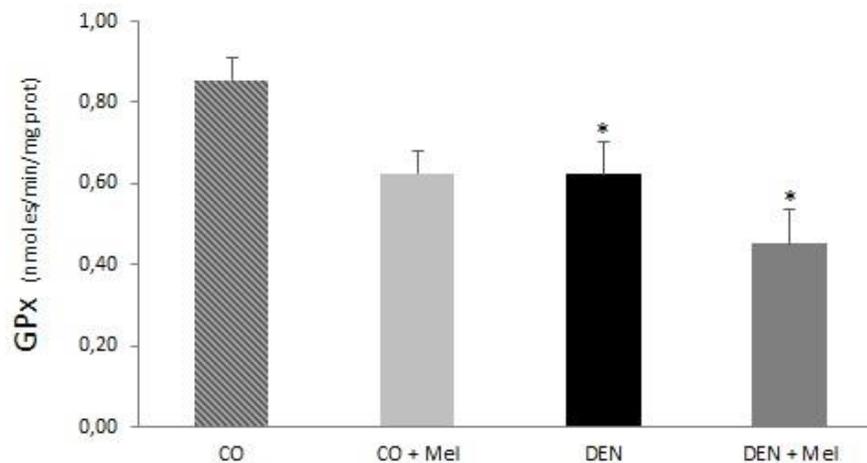


Figura 20: Efeito da administração de melatonina sobre a atividade da enzima GPx. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN e DEN+Mel em relação ao grupo CO ( $p < 0,01$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A atividade da GST no homogeneizado de fígado dos animais dos grupos em estudo é apresentada na Figura 21. Um aumento significativo foi observado nos animais do grupo DEN em relação aos grupos controles e há diferença significativa do grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN.

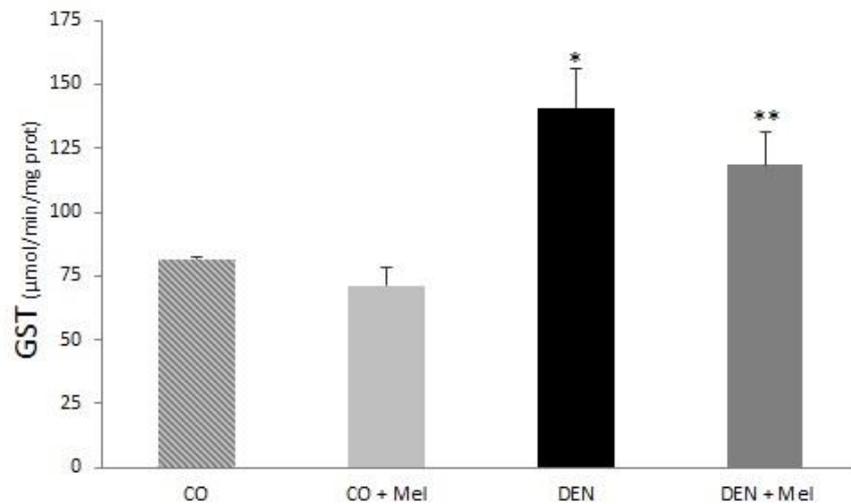


Figura 21: Efeito da administração da melatonina sobre a atividade da enzima GST. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN em relação aos grupos CO e CO+Mel ( $p < 0,001$ ). \*\*: diferença significativa do grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN ( $p < 0,05$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA

Na Figura 22, são apresentados os resultados dos níveis de GSH presentes no homogeneizado de fígado dos animais dos grupos em estudo. Uma diminuição significativa foi observada nos animais dos grupos DEN e DEN+Mel em relação aos grupos controles

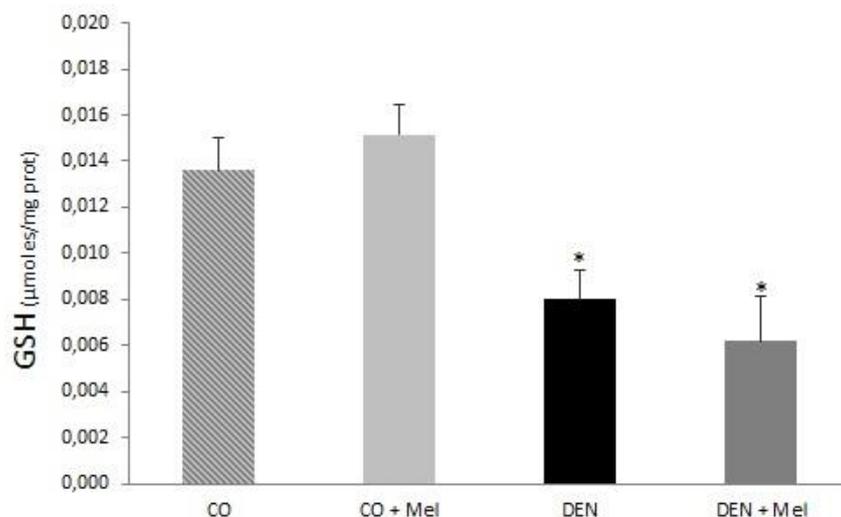


Figura 22: Efeito da administração de melatonina sobre os níveis de GSH. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN e DEN+Mel em relação aos grupos CO e CO+Mel ( $p < 0,001$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 5.9 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA ANGIOGÊNICA

Através da técnica de Western Blot foi possível observar a expressão de proteínas envolvidas na angiogênese tumoral. A expressão de VEGF, PI3K e Akt nos animais do grupo DEN foi significamente maior quando comparados aos grupos controles, enquanto o grupo DEN+Mel teve uma redução significativa na expressão dessas proteínas quando comparado ao grupo DEN. A expressão da proteína eNOS no grupo DEN foi significativamente menor em relação aos grupos controles e no grupo DEN+Mel observou-se o aumento significativo da expressão dessa proteína quando comparado ao grupo DEN (Figura 23).

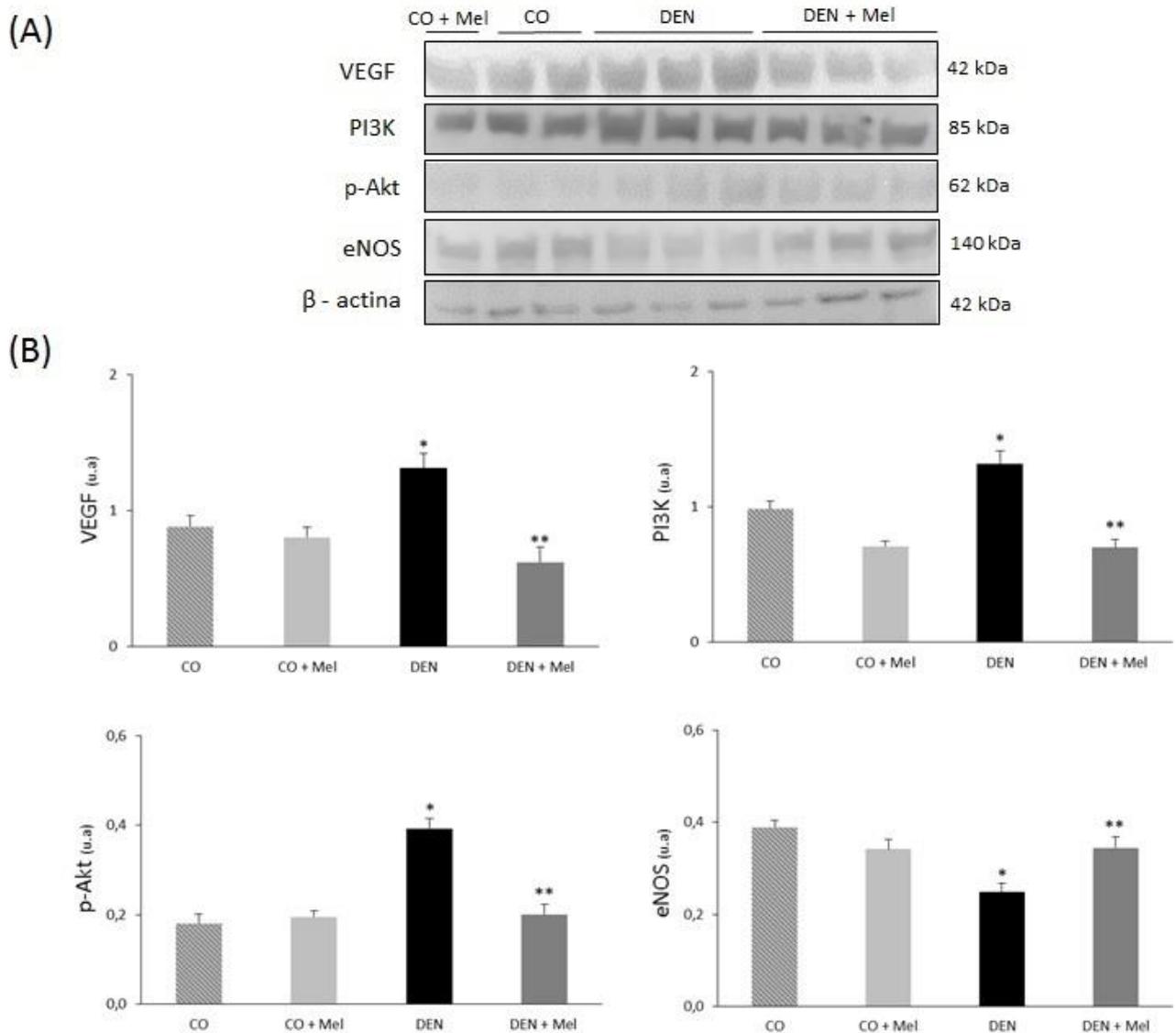


Figura 23: Efeito do DEN e da administração de Mel na rota angiogênica. (A) Imagem representativa da análise por Western Blot. (B) Quantificação Densiométrica. Dados expressos em média + desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN em relação aos grupos CO e CO + Mel ( $p < 0,001$ ); \*\*: diferença significativa do grupo DEN + Mel em relação ao grupo DEN ( $p < 0,001$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 5.10 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NITRICO

Na figura 24, observamos os valores referentes aos níveis nitritos e nitratos presentes no homogeneizado de fígado dos grupos experimentais. No grupo DEN observa-se diminuição significativa dos nitritos e nitratos totais em relação aos grupos controles. O grupo DEN+Mel apresentou aumento significativo desses valores em relação ao grupo DEN

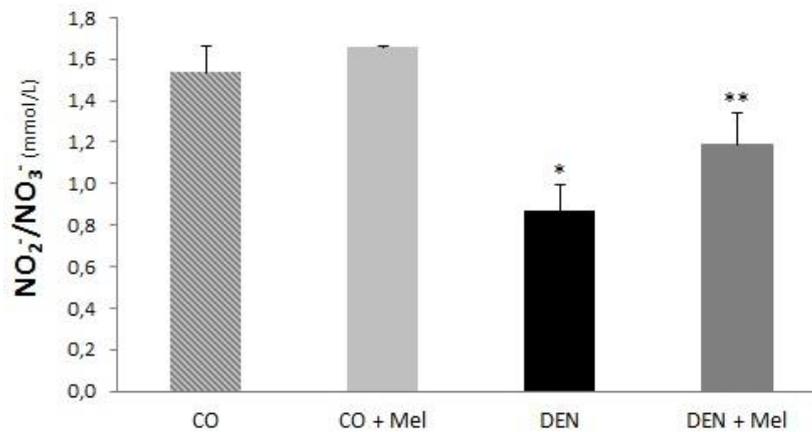


Figura 24: Efeito da administração de melatonina sobre os níveis de óxido nítrico (nitritos e nitratos). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo \*: diferença significativa do grupo DEN em relação aos grupos CO e CO+Mel ( $p < 0,001$ ). \*\*: diferença significativa do grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN ( $p < 0,01$ ). (Teste de Tukey,  $n = 8$  animais/grupo).

## 6 DISCUSSÃO

Os modelos experimentais de CHC são utilizados para que sejam estudados os mecanismos, genes e vias específicas envolvidas com o desenvolvimento tumoral (Fausto e Campbell, 2010). A indução química crônica é o método experimental que melhor reproduz os aspectos da carcinogênese hepática e o indutor químico mais amplamente utilizado é o DEN, um composto altamente genotóxico (Bakiri e Wagner, 2013). Frequentemente, em diversos protocolos experimentais, a quantidade e o tempo de exposição dos animais ao DEN é bastante variável e pode estar associada a outro agente químico promotor (Tolba *et al.*, 2015).

Nesse estudo foi utilizado o modelo experimental de carcinogênese hepática utilizando o DEN associado ao 2-AAF (Moreira *et al.*, 2015). Ao fim das 19 semanas de experimento, nossas análises evidenciaram que os animais que receberam DEN tiveram redução significativa em torno de 40% do seu peso corporal e aumento em torno de quatro vezes da RH quando comparado aos grupos controles. Outros estudos que avaliaram esses parâmetros observaram que a administração do DEN debilitou os animais ao ponto de seu peso corporal diminuir e provocou a formação da massa tumoral no fígado. Nódulos tumorais podem ter sido os responsáveis por aumentar o peso do fígado desses animais e conseqüentemente a RH (Arul e Subramanian, 2013; Moreira *et al.*, 2015b).

A presença dessa massa tumoral no grupo DEN possivelmente tem relação direta com a disfunção nos ductos hepáticos, tendo por conseqüência o aumento sérico a FA e a  $\gamma$ -GT (Tabela 2) (Moreira *et al.*, 2015). Essas enzimas são marcadores sorológicos úteis para o diagnóstico de lesão presente no sistema biliar e o aumento do seu nível sérico indica a presença de doença obstrutiva e/ou colestática (Barrett, 2014). As células tumorais de origem hepatocelular presentes no tecido podem também estar relacionadas ao aumento da  $\gamma$ -GT. Essa enzima tem importante relação com proteínas envolvidas na carcinogênese hepática, sendo um bom indicativo de agravamento do CHC (Moreira *et al.*, 2017).

A administração crônica e intermitente do DEN provoca alterações destrutivas no fígado, principalmente por meio de sua biotransformação e ação direta sobre as bases nitrogenadas do DNA. Além disso, ao ser metabolizado pelo citocromo P450,

o DEN produz ERO que irão danificar proteínas, lipídeos e o DNA dos hepatócitos, provocando acúmulo de danos no tecido hepático (Heindryckx *et al.*, 2009).

As ERO desempenham papel significativo na carcinogênese, uma vez que em altas concentrações seu efeito genotóxico e oxidativo podem iniciar o processo neoplásico (Gupta *et al.*, 2012). Os danos biológicos causados pelas ERO podem ser mensurados diretamente por meio da avaliação de LPO pela técnica de TBARS (Halliwell, 2007). Nesse estudo observamos que houve o aumento significativo do TBARS no fígado dos animais do grupo DEN comparado aos grupos controles (Figura 18). Sivaramakrishnan *et al.* (2008) e Malik *et al.* (2013) obtiveram resultados semelhantes e atribuem esse comportamento a metabolização do DEN que produz RL responsáveis por danificar lipídios.

A intensa LPO pode contribuir para o dano hepatocelular que também pode ser analisado através de mudanças consideráveis nos níveis circulantes de enzimas de integridade hepática e do padrão histológico do fígado (Barrett, 2014). No grupo DEN houve o aumento significativo da AST e ALT (Tabela 2) aliado à alterações histológicas expressivas que geraram desarquiteturação do tecido hepático (Figura 16C). Outros estudos obtiveram resultados semelhantes sugerem que as ERO produzidas pelo DEN e a intensa LPO estão relacionadas ao dano ao tecido (Sivaramakrishnan *et al.*, 2008; Balamurugan e Karthikeyan, 2012; Arul e Subramanian, 2013; Moreira *et al.*, 2015).

Uma forma de evitar que as ERO se acumulem e gerem danos ao tecido hepático é a ação de agentes antioxidantes como a CAT, a GPx e a GSH (Halliwell e Gutteridge, 2007). O grupo DEN apresentou redução significativa na atividade dessas enzimas em relação ao grupo CO (Figura 19, 20 e 22 respectivamente) o que pode ser associado a alterações metabólicas presentes nesse parênquima e causadas pelo processo neoplásico (Malik, *et al.*, 2013). Diferentemente da CAT e da GPx, a GST está diretamente ligada à eliminação de substâncias consideradas tóxicas ao organismo, como os xenobióticos. O grupo DEN teve aumento significativo em relação aos grupos controles da atividade da GST (Figura 21) devido a tentativa de detoxificar a grande quantidade de DEN e seus metabólitos presentes no parênquima hepático.

A Mel é um hormônio sintetizado pelos pinealócitos localizados na glândula pineal. Derivada do triptofano, essa molécula é decrita na literatura tendo diversas funções, tais como regulação do ritmo biológico, ação antioxidante, anti-inflamatória,

imuno e neuromoduladora (Reiter et al., 2014). Di Bella e seus colaboradores (2013) acreditam que essa versatilidade funcional da Mel pode também exercer efeitos anticancerígenos diretos e indiretos sobre diversos tipo de tumores.

Rahman e colaboradores (2003) observaram que a Mel foi capaz de suprimir a ocorrência de tumores hepáticos após a indução química com DEN e o uso do fenobarbital como agente promotor. Reduzindo a massa tumoral presente no parênquima hepático, o peso do fígado do animal não aumentou significativamente e, por isso a diminuição da RH no grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN (Tabela 2) foi observada no nosso estudo.

Estudo prévios relatam que a Mel tem efeito antioxidante direto e indireto que auxiliaria na remoção de ERO em doenças hepáticas (Rosa *et al.*, 2010; Bona, 2014). A estrutura molecular da Mel possui sítios doadores de elétrons localizados nos carbonos dois e três do anel pirrólico que estabilizam eletronicamente os RL presentes no parênquima hepático por meio da doação de elétrons. Reduzindo a reatividade dos RL ou das ERO, ocorre diminuição da peroxidação lipídica e preservação dos aspectos morfológicos e funcionais das membranas biológicas (Galano *et al.*, 2011; Reiter *et al.*, 2013). Esse perfil foi evidenciado em nosso estudo, pois a Mel foi capaz de reduzir a LPO quando comparado ao grupo DEN devido a estabilização de RL (Figura 18). A capacidade da Mel como *scavenger* de RL e de prevenir danos no tecido associado ao estresse oxidativo foi relatado em outros estudos corroborando a sua ação “varredora” de RL (Ruiz-Rabelo *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2009; Padillo *et al.*, 2010)

Além de potente *scavenger* de RL, a Mel é capaz de atuar modulando tanto atividade quanto expressão de enzimas antioxidantes, possivelmente devido a receptores de membrana específicos presentes no fígado (Reiter et al., 2014). Essa ação indireta foi observada em nosso estudo devido o aumento significativo da atividade da CAT no grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN (Figura 19). A GPx, entretanto, não apresentou diferença estatística em relação ao grupo DEN quando a Mel foi administrada (Figura 20). Uma vez que o parênquima hepático do grupo DEN+Mel apresenta-se com características cirróticas, é possível sugerir que a síntese de GSH no fígado esteja alterada em relação ao parêquima normal e devido a isso, não houve substrato para a ação da GPx (Czeczot *et al.*, 2006). A atividade da GST, por sua vez, apresentou-se diminuída significativamente no grupo DEN+Mel em relação ao grupo DEN (Figura 21). É possível sugerir que a Mel, além de reduzir

os danos oxidativos, tenha efeito hepatoprotetor que atua sinergicamente à ação de detoxificação dessa enzima (Reiter *et al.*, 2014b).

O perfil antioxidante da Mel foi observado de acordo com as análises relacionadas ao EO. A Mel reduziu o EO presente no parênquima dos animais que receberam o DEN e conseqüentemente houve a diminuição do dano hepatocelular, observado por meio da redução dos níveis séricos da AST e da  $\gamma$ -GT em relação aos animais do grupo DEN (Tabela 2), assim como o padrão histológico apresentou modificações características cirróticas e não neoplásicas (Figura 16D). Esse efeito hepatoprotetor da Mel, já descrito, parece estar relacionado tanto sua atividade antioxidante quanto a ação anti-inflamatória em doenças hepáticas (Mathes, 2010; Bona, 2014).

Após analisarem tecidos de CHC, Jo *et al.* (2011) concluíram que níveis elevados de EO podem contribuir para a progressão da angiogênese tumoral, fenômeno responsável por sustentar e manter o tumor. O VEGF é o principal modulador pró angiogênico que ativa a proliferação e migração das células endoteliais na formação de vasos anômalos que irão nutrir o tumor (Benazzi *et al.*, 2014). Nosso estudo demonstra que os animais com tumor do grupo DEN teve maior expressão de VEGF quando comparado aos grupos controles (Figura 23). A intensa fibrose presente no parênquima hepático desses animais (Figura 17C), possivelmente, propiciou a gênese de um ambiente hipóxico que favoreceu a transcrição de fatores induzíveis por hipóxia (HIF). Esses HIF são comumente associados a aumento na expressão de VEGF e desta forma, podem ser a causa da expressão aumentada dessa glicoproteína (Zhang *et al.*, 2015). O aumento de VEGF hepático em outros protocolos experimentais foi previamente descrito por outros autores que corroboram com nosso estudo (Subramanian *et al.*, 2007; Saraswati *et al.*, 2013).

Relatos anteriores descrevem que a Mel é capaz de reduzir a expressão de VEGF em CHC e em diferentes tipos de câncer (Abdel-Mawla *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2012; Alvarez-García *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2016) Esse mesmo comportamento da Mel também foi encontrado em nosso estudo (Figura 23). Com a redução da deposição de MEC no parênquima hepático dos animais tratados com Mel (Figura 17D), sugere-se que o ambiente hipóxico está reduzido e, conseqüentemente a transcrição de HIF e de VEGF.

O VEGF, uma vez presente no tecido, é capaz de ativar a via da proteína Akt em diversos tipos de câncer. Essa via está diretamente ligada à angiogênese, sendo relacionada com a permeabilidade vascular causada pelo VEGF (Bates e Jones, 2003). Os animais do grupo DEN apresentaram aumento significativo da expressão de PI3K e Akt (Figura 23), porém, a via PI3K/Akt não gerou o aumento da expressão da eNOS (Figura 23). Provavelmente, os mecanismos moleculares que induzem a permeabilidade vascular não dependem da ativação da proteína eNOS. Portanto, sugere-se que esse mecanismo esteja relacionado a ativação da proteína guanilil ciclase e GMPc por meio de uma via dependente de NO (Roy *et al.*, 2006). Além disso, o aumento significativo da expressão de PI3K e Akt pode ser explicado devido a essas proteínas também participarem de outras vias moleculares como a de sobrevivência celular no câncer (Sadeghi e Gerber, 2012).

A menor expressão da eNOS tem por consequência a redução significativa dos níveis dos metabólitos do NO (Figura 24). Decker e colaboradores (2008) acreditam que a redução da expressão da eNOS é importante sinal para o estabelecimento do carcinoma, pois quanto menos essa proteína é expressada maior é o desenvolvimento e quantidade de tumores no tecido. Além disso, Ridnour *et al* (2005) considera que concentrações discretas de NO estabilizam proteínas sinalizadoras importantes na biologia tumoral, sendo, portanto, importante na expansão tumoral.

Quando a Mel foi administrada aos animais, houve a diminuição significativa das proteínas PI3K/Akt (Figura 23). Paroni *et al* (2014) considera a inibição da fosforilação de Akt como efeito antitumoral, pois Akt é predizente de um desfecho desfavorável no câncer de próstata. Possivelmente a diminuição da expressão dessas proteínas pode estar ligada a propriedades oncostáticas da Mel.

O aumento significativo da expressão da eNOS (Figura 23) nos animais do grupo DEN+Mel pode ser explicado de acordo com Dayoub *et al* (2011). Esses autores relatam que quando a eNOS está diminuída gera danos extensos por agregação plaquetária e infiltração de neutrófilos, porém quando há aumento dessa enzima observa-se efeito positivo, ou seja, há a proteção do endotélio. A diminuição dos níveis dos metabólitos do NO (Figura 24) pode ser explicados devido a diminuição na expressão da eNOS, uma vez que essa enzima é responsável pela produção de NO (Zhao *et al.*, 2015).

Constatamos por meio de nosso estudo que a Mel foi capaz de minimizar os danos no parênquima hepático, avaliados na histologicamente e também por meio das enzimas de função hepática. Além disso, sua atividade antioxidante foi capaz de reduzir a lipoperoxidação e estimular de enzimas antioxidante como a CAT. Por fim, essa indolamina mostrou-se eficaz na redução de VEGF e da via PI3K/Akt, sendo, portanto, promissora no combate à angiogênese tumoral.

## 7 CONCLUSÃO

1. Ao avaliarmos o peso dos animais ao longo do experimento, concluímos que o grupo DEN demonstrou uma diminuição no peso médio final e um aumento da relação hepatossomática. A Mel foi capaz de manter a relação hepatossomática destes animais.
2. Na avaliação da integridade hepática por meio das análises séricas AST, ALT, FA,  $\gamma$ -GT observamos um aumento significativo de todas essas enzimas no grupo DEN, evidenciando o dano hepatocelular. A Mel foi capaz de reduzir os níveis de AST e  $\gamma$ -GT, tendo, portanto, uma ação protetora no fígado.
3. Na avaliação histológica e de fibrogênese do tecido hepático constatamos que o grupo DEN desenvolveu nódulos tumorais com presença de intensa deposição de MEC, enquanto que os animais que receberam Mel apresentaram lesões pré-cancerosas com nódulos regenerativos e menor deposição de MEC.
4. Ao avaliarmos a LPO, através o método de TBARS, observamos um aumento significativo do grupo DEN em relação os grupos controles e a Mel foi capaz de reduzir o dano oxidativo através da redução significativa dos níveis de TBARS.
5. A atividade da GST mostrou-se significativamente aumentada no grupo DEN, enquanto a atividade das enzimas CAT e GPx diminuídas significativamente. O tratamento com Mel foi capaz de aumentar significativamente a atividade da enzima CAT e diminuir a atividade da GST.
6. Os níveis de GSH foram reduzidos nos animais do grupo DEN, sendo que a Mel não foi capaz de reestabelecer os níveis desse peptídeo ao nível dos animais dos grupos controles.
7. A expressão das proteínas relacionadas à angiogênese tumoral (VEGF, PI3K, p-Akt) mostrou-se aumentada nos animais do grupo DEN, sendo que a Mel foi capaz de diminuir significativamente a expressão dessas proteínas. A expressão da eNOS aumentou significativamente nos animais tratados com Mel quando comparadas ao grupo DEN;
8. Ao avaliarmos os metabólitos do óxido nítrico no tecido hepático observamos uma diminuição significativa desses valores nos animais do grupo DEN, enquanto que o tratamento com Mel foi capaz de aumentar esses níveis.

Nossos resultados demonstraram que a melatonina capaz de minimizar os danos no parênquima hepático, reduzir a lipoperoxidação e estimular as enzimas antioxidantes, como a CAT. Além disso mostrou-se eficaz na redução de VEGF e da via PI3K/Akt.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAWLA, A. A. et al. Induction of hepatocellular carcinoma in mice and the role of melatonin. **JoBAZ**. 66: 206–222 p. 2013.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.
- ALI, E. M.; SHETA, M.; MOHSEN, M. A. E. Elevated serum and tissue VEGF associated with poor outcome in breast cancer patients. **Alexandria Med J**. 47: 217–224 p. 2011.
- ALVAREZ-GARCÍA, V. et al. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. **Microvasc Res**, v. 87, p. 25-33, 2013.
- ARUL, D.; SUBRAMANIAN, P. Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 434, n. 2, p. 203-9, 2013.
- BAKIRI, L.; WAGNER, E. F. Mouse models for liver cancer. **Mol Oncol**, v. 7, n. 2, p. 206-23, 2013.
- BALAMURUGAN, K.; KARTHIKEYAN, J. Evaluation of Luteolin in the Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced Hepatocellular Carcinoma Using Animal Model System. **Indian J Clin Biochem**, v. 27, n. 2, p. 157-63, 2012.
- BARRETT, K. E. Anatomia funcional do fígado e do sistema biliar. In: BARRETT, K. E. *Fisiologia gastrointestinal*. Porto Alegre: AMGH, 2014. p 182-202.
- BARRETT, K. E. & RAYBOULD, H. E. Fisiologia Gastrointestinal. In: KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Berne & Levy: Fisiologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap., p.491-558.
- BATES, D. O.; JONES, R. O. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 2, n. 2, p. 107-20, 2003.
- BENAZZI, C. et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 919570, 2014.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-8, 1963.

BOARD, P. G.; MENON, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3267-88, 2013.

BONA, S. Melatonina protege o fígado em um modelo experimental de cirrose. 2014. 95 (Doutorado). Faculdade de Medicina, Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p. 707-16, 1973.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254 p. 1976.

BRASIL. Lei Federal nº 11.794. Procedimentos para o uso científico de animais. BRASIL, R. F. D. Brasília, DF: Diário Oficial da União. 11794. 8 de outubro de 2008.

BRIEGER, K. et al. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. w13659, 2012.

BRUIX, J.; GORES, G. J.; MAZZAFERRO, V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 844-55, 2014.

BRY, M. et al. Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. **Physiol Rev**, v. 94, n. 3, p. 779-94, Jul 2014.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.

CARBAJO-PESCADOR, S. et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. **Br J Cancer**, v. 109, n. 1, p. 83-91, 2013.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. **Acta Cirur Bras.** São Paulo. 17: 417-423 p. 2002.

COLARES, J. R. et al. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 40, p. 8918-8928, 2016.

COLOMBO, J. et al. Effects of melatonin on HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression and on the invasive properties of hepatocarcinoma cells. **Oncol Lett**, v. 12, n. 1, p. 231-237, 2016.

CZECZOT, H. et al. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Acta Biochim Pol**, v. 53, n. 1, p. 237-42, 2006.

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochem Soc Symp**, v. 61, p. 1-31, 1995.

DAYOUB, J. C. et al. Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide. **J Pineal Res**, v. 51, n. 3, p. 324-30, 2011.

DECKER, N. K. et al. Nitric oxide regulates tumor cell cross-talk with stromal cells in the tumor microenvironment of the liver. **Am J Pathol**, v. 173, n. 4, p. 1002-12, 2008.

DELLI CARPINI, J. et al. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 43-58, 2010.

DI BELLA, G. et al. Melatonin anticancer effects: Review. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 2410-30, 2013.

DING, J.; WANG, H. Multiple interactive factors in hepatocarcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 346, n. 1, p. 17-23, 2014.

DJORDJEVIĆ, V. B. Free radicals in cell biology. **Int Rev Cytol**, v. 237, p. 57-89, 2004.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. Nitric oxide revision. **J. Bras. Pat. Med. Lab.** Rio de Janeiro. 39: 343-350 p. 2003.

ELPEK, G. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 23, p. 7260-76, 2014.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. Mouse models of hepatocellular carcinoma. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 1, p. 87-98, 2010.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**, v. 285, n. 21, p. 1182-6, 1971.

\_\_\_\_\_. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 4, p. 273-86, 2007.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 125-72, 2008.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **J Pineal Res**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

GRANGER, D. L. et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods Enzymol**, v. 301, p. 49-61, 1999.

GUPTA, S. C. et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 11, p. 1295-322, 2012.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radical in Biology and Medicine**. Oxford University Press, 2007. 704.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VAN VLIERBERGHE, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int J Exp Pathol**, v. 90, n. 4, p. 367-86, 2009.

HERNANDEZ-GEA, V. et al. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 144, n. 3, p. 512-27, 2013.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1011-27, 2005.

HU, P. et al. High circulating VEGF level predicts poor overall survival in lung cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 7, p. 1157-67, 2013.

JO, M. et al. Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol**, v. 46, n. 6, p. 809-21, 2011

JUNG, K. H. et al. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. **J Pineal Res**, v. 47, n. 2, p. 173-83, 2009.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422-33, 2003.

KIKUCHI, L. et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Antivir Ther**, v. 18, n. 3 Pt B, p. 445-9, 2013.

KLAUNIG, J. E. et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environ Health Perspect**, v. 106 Suppl 1, p. 289-95, 1998.

LAEMMLL, U. K.; MÖLBERT, E.; KELLENBERGER, E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. **J. of Mol. Biol.** 49: 99-113 p. 1970.

LAFARO, K. J.; DEMIRJIAN, A. N.; PAWLIK, T. M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 24, n. 1, p. 1-17, 2015.

LI, Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896-39921, 2017.

LICCIONI, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Treatment of hepatocellular carcinoma. **Dig Dis**, v. 32, n. 5, p. 554-63, 2014.

LIEDTKE, C. et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 6, n. 1, p. 19, 2013.

LLESUY, S. F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**, v. 71, n. 3, p. 241-9, 1985.

LLOVET, J. M. et al. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 8, p. 2290-300, 2012.

LV, D. et al. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. **Chin J Cancer Res**, v. 24, n. 4, p. 310-6, 2012.

MALIK, S. et al. DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. **Protoplasma**, v. 250, n. 1, p. 175-83, 2013.

MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. Glutathione transferase (human placenta). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 231-5, 1981.

MATHES, A. M. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 48, p. 6087-97, 2010.

MOLPECERES, V. et al. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 62, n. 7, p. 687-95, 2007.

MOREIRA, A. J. et al. Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats. **Toxicol Rep**. 2333–340 p. 2015.

\_\_\_\_\_. Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144517, 2015b

\_\_\_\_\_. Ductular reaction, cytokeratin 7 positivity, and gamma-glutamyl transferase in multistage hepatocarcinogenesis in rats. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 911-920, 2017.

MORGAN-MARTINS, M. I. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. In: MARRONI, N. P.; MORGAN-MARTINS, M. I.; PORAWSKI, M. (Org). *Radicais livres no processo saúde-doenças: da bancada à clínica*. Curitiba: CRV, 2012. p 9-35.

PADILLO, F. J. et al. Melatonin and celecoxib improve the outcomes in hamsters with experimental pancreatic cancer. **J Pineal Res**, v. 49, n. 3, p. 264-70, 2010.

PARONI, R. et al. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling. **J Pineal Res**, v. 57, n. 1, p. 43-52, 2014.

PELLICORO, A. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 181-94, 2014.

PIGUET, A. C.; DUFOUR, J. F. PI(3)K/PTEN/AKT pathway. **J Hepatol**, v. 54, n. 6, p. 1317-9, 2011.

RAHMAN, K. M. et al. Chemopreventive effects of melatonin on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. **Nutr Cancer**, v. 47, n. 2, p. 148-55, 2003.

REITER, R. J. et al. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. **Mini Rev Med Chem**, v. 13, n. 3, p. 373-84, 2013.

\_\_\_\_\_. Melatonin: exceeding expectations. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 5, p. 325-33, Sep 2014.

\_\_\_\_\_. Melatonin in the biliary tract and liver: health implications. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 30, p. 4788-801, 2014b.

\_\_\_\_\_. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 4, 2017.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

RIDNOUR, L. A. et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 37, p. 13147-52, 2005.

ROSA, D. P. et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arq Gastroenterol**, v. 47, n. 1, p. 72-8, 2010.

ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett**, v. 580, n. 12, p. 2879-87, 2006.

RUIZ-RABELO, J. F. et al. Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer. **J Pineal Res**, v. 43, n. 3, p. 270-5, 2007.

SADEGHI, N.; GERBER, D. E. Targeting the PI3K pathway for cancer therapy. **Future Med Chem**, v. 4, n. 9, p. 1153-69, 2012.

SARASWATI, S.; ALHAIDER, A. A.; AGRAWAL, S. S. Anticarcinogenic effect of brucine in diethylnitrosamine initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats. **Chem Biol Interact**, v. 206, n. 2, p. 214-21, 2013.

SCHEMITT, E. G. Ação da glutamina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório na insuficiência hepática aguda grave. 2014. 87 (Mestrado). Faculdade de Medicina, Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

SIVARAMAKRISHNAN, V. et al. Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. **Chem Biol Interact**, v. 171, n. 1, p. 79-88, 2008.

SUBRAMANIAN, P. et al. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. **J Pineal Res**, v. 43, n. 3, p. 305-12, 2007.

TOLBA, R. et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. **Lab Anim**, v. 49, n. 1 Suppl, p. 59-69, 2015.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Lett**, v. 266, n. 1, p. 37-52, 2008.

VEZOZZO, D. C. P.; CARRILHO, F. J. Rastreamento do carcinoma hepatocelular: como e quando? **Oncol**, 30-33 p. 2014.

VRANCKEN, K.; PAESHUYSE, J.; LIEKENS, S. Angiogenic activity of hepatitis B and C viruses. **Antivir Chem Chemother**, v. 22, n. 4, p. 159-70, 2012.

WALLACE, M. C. et al. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 765-79, 2015.

WANG, Z. et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Semin Cancer Biol**, v. 35 Suppl, p. S224-43, 2015.

WELEDJI, E. P. et al. How grim is hepatocellular carcinoma? **Ann Med Surg (Lond)**, v. 3, n. 3, p. 71-6, 2014.

YEOM, S. K. et al. Prediction of liver cirrhosis, using diagnostic imaging tools. **World J Hepatol**, v. 7, n. 17, p. 2069-79, 2015.

ZHANG, Z. et al. Update on implications and mechanisms of angiogenesis in liver fibrosis. **Hepatol Res**, v. 45, n. 2, p. 162-78, 2015.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **J Pharmacol Sci**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

## ANEXOS

Carta de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 140311

**Data da Versão do Projeto:** 23/07/2014

**Pesquisadores:**

NORMA ANAIR POSSA MARRONI

ANDREA JANZ MOREIRA

SILVIA BONA

**Título:** Carcinogêneses Hepática e a ação da Melatonina sobre o perfil de marcadores de estresse celular e a apoptose

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 23 de julho de 2014.

Profª Iraci Lucena da Silva Torres  
Coordenadora CEUA/HCPA