

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

**A MELATONINA ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO, ATIVA O
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E A APOPTOSE
NA HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL**

Andrea Cristiane Janz Moreira

Porto Alegre, RS, 2015

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

**A MELATONINA ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO, ATIVA O
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E A APOPTOSE
NA HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL**

Andrea Cristiane Janz Moreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Norma Possa Marroni

*Tese de Doutorado apresentada
ao curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia
da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul/ UFRGS.*

Porto Alegre, RS, 2015

Dedico esta tese à

MINHA FAMÍLIA.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, *meu muito obrigada*. Em especial:

- Às agências financiadoras, CNPq, CAPES e FINEP/HCPA que fomentaram esta tese, sendo possível realizar todas as análises previstas.
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pela excelente base científica, contribuindo na minha formação acadêmica.
- Aos colegas do Laboratório Experimental em Gastroenterologia e Hepatologia e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes (ULBRA) pela agradável convivência e pelo profissionalismo do trabalho em grupo.
- Aos professores Dr Jorge Luis dos Santos e Dr Carlos Thadeu Cerski pelos ensinamentos, que certamente contribuíram para a interpretação destes resultados.
- Aos professores Dr Javier González Gallego e Dr José Luis Mauriz pela colaboração no estudo da apoptose e pelas inúmeras sugestões para o melhoramento desta tese.
- À Dra Graziella Ramos Rodrigues pela imprescindível ajuda para estabelecer o modelo de carcinogênese hepática, pela amizade que se estreitou durante estes quatro anos.
- À Dra Silvia Bona pela parceria nestes últimos anos, pela colaboração na concretização deste estudo.
- Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pela presteza, disponibilidade e apoio nas questões administrativas ao longo destes quatro anos.
- Ao Dr Claudio Augusto Marroni pelas excelentes contribuições técnicas, pelas inúmeras revisões dos materiais escritos, pelas sugestões e explicações sobre carcinoma hepatocelular, tornando este assunto cada vez mais familiar.
- À Prof^a Norma Possa Marroni, meus mais sinceros agradecimentos, por me conceder o desafio do desenvolvimento deste trabalho, pela confiança, pela dedicação em cada etapa, pela ajuda incondicional e pela amizade.

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)	18
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO NA CARCINOGENESE.....	20
1.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES: SISTEMA ENZIMÁTICO E NÃO ENZIMÁTICO	23
1.4 MELATONINA: CARACTERÍSTICAS E AÇÕES SOBRE A SINALIZAÇÃO CELULAR	25
1.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E SUAS RELAÇÕES DURANTE A CARCINOGENESE	28
1.5.1 Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF κ B).....	28
1.5.2 Estresse de retículo e apoptose na carcinogênese	30
1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CARCINOGENESE HEPÁTICA.....	36
1.6.1 Modelo experimental de CHC por indução química	38
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARA O EXPERIMENTO I	42
2.2.1. Determinar o modelo experimental de Carcinoma Hepatocelular e comparar lesões pré-cancerosas (PL) com CHC avançado.....	42
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARA O EXPERIMENTO II	42
2.3.1. Determinar a ação da Melatonina na carcinogênese hepática experimental sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e a apoptose.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. EXPERIMENTO I: DETERMINAR O MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA HEPATOCELULAR E COMPARAR LESÕES PRÉ-CANCEROSAS (PL) COM CHC AVANÇADO	46
3.1.1 Delineamento da pesquisa	46
3.1.2 População em estudo.....	46
3.1.3 Delineamento experimental.....	46
3.2 EXPERIMENTO II: ESTUDAR O EFEITO DA MELATONINA DURANTE A HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E APOPTOSE.	52
3.2.1 Delineamento da pesquisa	52
3.2.2 População em estudo.....	52
3.2.3 Delineamento experimental.....	53
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4 RESULTADOS	61
4.1 RESULTADOS GERAIS DO EXPERIMENTO I (CEP/ HCPA/ FIPE – 120355).....	61
4.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO II (CEP/ FIPE/ HCPA 140311)	75
5 DISCUSSÃO	143
CONCLUSÃO.....	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
ANEXOS	187

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlet
2-AAF	Acetilaminofluoreno 2
ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina aminotransferase
AP1	Fator de transcrição proteína ativadora 1
ARE	Elemento responsivo a antioxidantes
AST	Aspartato aminotransferase
ATF	<i>Activating transcription fator</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein or immunoglobulin heavy chain-binding protein</i>
C/EBP	<i>CCAAT-Enhancer-Binding Protein</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent Aspartate-Specific Proteases</i>
CAT	Catalase
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase
DEN	Dietilnitrosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAN	Espécies ativas de nitrogênio
EAO	Espécies ativas de oxigênio
EGF	Fator de crescimento epidermal
eIF	Fator de iniciação da Tradução de Eucariotos
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
FA	Fosfatase alcalina
GADD	<i>Growth-arrest DNA-damage gene</i>
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GRP78	Proteínas regulada por Glicose
GST	Glutaciona
GST-P	Glutaciona S Transferase Placentária
GSSH	Glutaciona Oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF	Fator induzível à hipóxia
HSP	<i>Heat Shock Protein – Proteína de choque térmico</i>
iHSP	Proteína de choque térmico induzida (HSP72)
cHSP	Proteína de choque térmico constitutiva (HSP73)
IGF	Fator de crescimento de insulina
I κ B	Inibidor Kappa B
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
IRE	<i>Inositol-requiring enzyme - Proteína Cinase dependente de Inositol</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>
LPO	Lipoperoxidação
MEL	Melatonina

NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotideo
NF _κ B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NQO1	NADPH quinona oxidoreductase 1
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OCl ⁻	Ânion hipoclorito
·OH	Radical hidroxil
ONOO·	Peróxido nitrito
PB	Fenobarbital
P65	Proteína Rel A classe II família NF _κ B
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PKA	Proteína quinase A
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PL	Lesões pré-cancerosas
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Acido ribonucleico
RO·	Radical alcóxil
ROO·	Radical peróxil
SOD	Superóxido de dismutase
TAA	Tioacetamida
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TGF-1β	Fator de crescimento de transformação 1 beta
UPR	<i>Unfolder protein response</i>
VHB	Hepatite por vírus B
VHC	Hepatite por vírus C
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
XRE	Elemento responsivo a xenobióticos
α-ATF	Alfa-fetoproteína
γGT	Gama-glutamilttransferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da geração das espécies ativas de oxigênio (EAO) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN).	21
Figura 2	Sistema de defesa antioxidante e a interação entre as enzimas.	24
Figura 3	Estrutura química da Melatonina.	26
Figura 4	Ativação do Fator nuclear kB.	28
Figura 5	Esquema das complexas vias do receptor de membrana e as cascatas de sinalizações que ocorrem no citoplasma e núcleo celular.	30
Figura 6	Esquema entre o estresse de retículo endoplasmático e a apoptose.	32
Figura 7	Relação entre o desenvolvimento do processo de doença crônica inflamatória com alterações celulares malignas.	34
Figura 8	Via da apoptose ativando a caspase 3.	35
Figura 9	Formação de adutos do DNA por agentes carcinogênicos.	38
Figura 10	Quadro das fases experimentais e seus respectivos projetos.	45
Figura 11	Descrição completa dos protocolos experimentais para indução do carcinoma hepatocelular.	48
Figura 12	Descrição do protocolo de exposição crônica e intermitente de CHC avançado.	53
Figura 13	Desenho experimental de indução ao carcinoma hepatocelular e tempos de tratamentos com melatonina 20mg/ L.	54
Figura 14	Quadro descritivo dos anticorpos utilizados e suas características técnicas.	58
Figura 15	Gráfico da relação hepatossomática.	62
Figura 16	Aspectos macroscópicos dos tumores.	63
Figura 17	Fotomicrografias dos fígados por grupo testado.	64
Figura 18a	Modelo esquemático da ação das espécies ativas de oxigênio sobre os lipídios, proteínas e DNA sob condições de hepatocarcinogênese sem a presença de Melatonina.	154
Figura 18b	Modelo esquemático da ação das espécies ativas de oxigênio sobre os lipídios, proteínas e DNA sob condições de hepatocarcinogênese com a presença de Melatonina.	155
Figura 19	Relação entre o desenvolvimento da doença crônica inflamatória com alterações celulares malignas e a ação da melatonina neste processo.	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Causa da morte dos animais	61
Tabela 2	Média do peso inicial e final por grupo avaliado	62
Tabela 3	Valores das enzimas de integridade hepática por grupo	63
Tabela 4	Percentual de animais com CHC por protocolo de indução	65

PREFÁCIO

Esta tese foi realizada nas instalações do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, do HCPA vinculado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/ UFRGS, pertencente ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Teve como apoio técnico o Instituto de Biomedicina da Universidade de León, o Serviço de Patologia Experimental do HCPA, a Unidade de Análise Molecular de Proteínas e Unidade Experimentação Animal do HCPA.

Este estudo teve o apoio de agências nacionais e estadual, entre elas Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

A estrutura desta tese se divide em uma revisão sobre assuntos pertinentes ao tema, para estabelecer os antecedentes sobre o carcinoma hepatocelular (CHC). Segue com três artigos, o primeiro, propõe modelo experimental de CHC e a avaliação do estresse oxidativo; o segundo avalia a ação da melatonina sobre o estresse oxidativo durante a carcinogênese hepática experimental e o terceiro, estuda os efeitos da melatonina sobre o estresse de retículo e as vias da apoptose durante a hepatocarcinogênese. No item resultado estão os artigos que respondem os objetivos formulados por esta tese. Finalizando por uma discussão geral e suas conclusões.

Resumo

Resumo Geral

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a quarta causa mais frequente de morte por câncer em todo o mundo. Este estudo teve dois grandes objetivos, o primeiro foi estabelecer o carcinoma hepatocelular experimental por indução química e o segundo estudar os efeitos da melatonina sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e apoptose durante a hepatocarcinogênese. Foram realizados dois experimentos, ambos utilizaram dietilnitrosamina (DEN) mais acetilaminofluoreno (2-AAF) em ratos Wistar machos pesando 145-150 g. O primeiro estudo testou 3 protocolos de indução do câncer hepático. Os animais foram divididos em três grupos testes: DEN50: que recebeu DEN 50 mg duas vezes por semana até a 6ª semana e uma vez por semana nas semanas 11 a 13. DEN75: recebeu DEN 75mg uma vez por semana nas semanas até a 6ª semana e um reforço nas semanas de 11 a 13. DEN100: recebeu 5 doses de DEN 100mg uma a cada seis semanas por 28 semanas. Todos receberam 2- AAF dose única de 100 mg na 4ª semana. Após a indução foi comprovado por testes bioquímicos, macroscópico e histológico que o protocolo DEN50 desenvolve CHC avançado em 19 semanas, apresentou a fase inflamatória na 5ª semana e cirrose na 12ª semana. O protocolo DEN100 exibe padrão de lesões pré-cancerosas com cirrose em 28 semanas. O protocolo DEN75 foi o mais heterogêneo dos três, pois desenvolveu lesões pré-cancerosas, cancer inicial e CHC avançado. O segundo estudo, repetiu o protocolo DEN50 e administrou melatonina 20mg/L. Os tratamentos começaram nas semanas 5 e 12. Ao final de 19 semanas foi observado que animais do grupo que só recebeu DEN+2-AAF (DEN-CHC) desenvolveram carcinoma avançado, exibiram mais expressão de proteínas pró-inflamatórias (iNOS, COX-2 e NFκB). E animais tratados com Melatonina (DEN+MEL5 e DEN+MEL 12) apresentaram padrão histológico de cirrose e reduzida expressão destas proteínas. Quanto ao comportamento oxidativo foi observado que grupo DEN-CHC apresentou menor lipoperoxidação (LPO) por redução de ácidos graxos poliinsaturados, maior oxidação proteica, menor atividade da SOD e maior índice de danos ao DNA. O tratamento com melatonina ao longo da hepatocarcinogênese se mostrou efetivo para proteger a membrana lipídica, reduziu a oxidação proteica, aumentou a atividade da SOD e atenuou o dano ao DNA. Por fim, referente ao estresse de retículo endoplasmático e apoptose, animais com DEN-CHC não apresentaram ativação das proteínas de estresse de retículo (BiP, ATF6 e CHOP) nem acionaram as rotas apoptóticas. Entretanto, animais tratados com Melatonina tiveram aumento significativo na expressão de proteínas como

BiP, ATF6 e CHOP, assim como proteínas pró-apoptóticas. Nossos resultados apontam que a melatonina, durante o processo de hepatocarcinogênese experimental, atuou como anti-inflamatório, antioxidante e pró-apoptótico. E estas ações contribuíram para evitar a progressão do carcinoma hepatocelular.

Palavras Chaves: carcinoma hepatocelular, estresse oxidativo, melatonina, estresse de retículo endoplasmático, apoptose.

Abstract

General Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth most frequent cause of cancer death worldwide. This study had two main objectives, the first was to establish the experimental hepatocellular carcinoma by chemical induction and the second study the effects of melatonin on oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis during hepatocarcinogenesis. Two experiments were conducted, both used Diethylnitrosamine (DEN) + acetylaminofluorene (2-AAF) in male Wistar rats weighing 145-150 g. The first study tested three induction protocols of liver cancer. The animals were divided into three test groups: DEN50: DEN that received 50 mg twice a week until 6 weeks and once a week during the weeks 11 and 13. DEN75: DEN received 75mg once a week during the weeks to 6 weeks and another reinforcement in weeks 11 to 13 DEN100: DEN received 5 doses of 100mg one every six weeks for 28 weeks. All received 2 AAF single dose of 100 mg at week 4. After induction was confirmed by biochemical, macroscopic and histological tests that DEN50 protocol develops advanced HCC in 19 weeks, presents inflammatory phase in the 5th week and cirrhosis at 12 weeks. The default display protocol DEN100 of precancerous lesions and cirrhosis in 28 weeks. DEN75 The protocol was the most heterogeneous of the three, as developed precancerous lesions, early cancer and advanced HCC. The second study, repeated the DEN50 protocol and administered melatonin 20mg / L. The treatments began on week 5 and 12. At the end of 19 weeks was observed that animals in the group that received only DEN (DEN-CHC) developed advanced carcinoma exhibited over expression of proinflammatory proteins (iNOS, COX-2 and NFkB). And animals treated with melatonin (DEN+ MEL5W and DEN+MEL 12W) showed histological pattern of cirrhosis and reduced expression of these proteins. As for the oxidative behavior was observed that DEN-HCC group had lower lipid peroxidation (LPO) by reducing polyunsaturated fatty acids, higher protein oxidation, lower activity of SOD and higher rate of DNA damage. Treatment with melatonin throughout hepatocarcinogenesis was effective to protect the lipid membrane, protein oxidation decreased, increased SOD activity and attenuated DNA damage. Finally, referring to the endoplasmic reticulum stress and apoptosis, animal DEN-CHC did not show activation of reticulum stress protein (BiP, ATF6 and CHOP) or triggered apoptotic routes. However, melatonin treated animals had a significant increase in the expression of proteins and BiP, CHOP and ATF6, as well as pro-apoptotic proteins. Our results indicate that melatonin, during the process of experimental hepatocarcinogenesis,

acted as anti-inflammatory, antioxidant and pro-apoptotic. And these actions contributed to prevent progression of hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocarcinoma; diethylnitrosamine; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; nitric oxide synthase; heat shock protein.

1 Referencial Teórico

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Carcinoma hepatocelular (CHC)

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor maligno primário mais comum do fígado, e ocorre como uma complicação da doença hepática crônica. É o 4º tumor maligno mais frequente no mundo, com mais de 700.000 novos casos por ano, sendo quatro vezes mais comum em homens do que em mulheres (Ferlay et al., 2010a; 2010b).

As doenças hepáticas crônicas, como as cirroses alcoólica e por vírus da hepatite B ou C (VHB e VHC), deficiência de α 1-antitripsina, hemocromatose e tirosinemia, são fatores de risco que predispõem ao CHC. Estas doenças danificam crônica e lentamente os hepatócitos, podendo induzir mitoses, tornando o DNA dessas células mais suscetível a alterações genéticas. Em pacientes VHC positivo, o CHC surge, em geral 30 anos após a contaminação, quase exclusivamente em pacientes cirróticos (Bruix et al., 2004).

Já foi comprovada a capacidade do DNA do VHB de se integrar ao DNA do hospedeiro, embora o mesmo não tenha sido comprovado para o VHC. Tal fato obscurece o mecanismo de carcinogênese pelo VHC, levantando a possibilidade do surgimento de clone maligno pelos vários ciclos de regeneração e reparo no fígado. Em pacientes cirróticos com hepatite C crônica, a incidência anual de CHC é de 1,5-4% (Kanai, Hirohashi et al., 1987; Kojiro, 1989; Kondo, Wada et al., 1989; Nakashima, Sugihara et al., 1995).

As possibilidades terapêuticas para o CHC são muito limitadas, pois a maioria dos casos se apresenta como tumor avançado e sem possibilidades de cura. O ideal é diagnosticar precocemente, na fase incipiente, com pequeno tamanho, quando as possibilidades de tratamento curativo podem ser efetivas (resseção cirúrgica, radiofrequência, alcoolização), principalmente o transplante hepático (Bruix et al., 2012; Bruix et al., 2015). O rastreamento dos pacientes com doenças predisponentes ao CHC é fator fundamental para o diagnóstico precoce e terapêutica eficaz. O melhor método de rastreamento é a realização periódica de ecografia abdominal. As análises sanguíneas podem mostrar alterações enzimáticas como a elevação da fosfatase alcalina ou da α -fetoproteína nos casos avançados (Bolondi, 2003). Conforme Vezozzo e Carrilho (2014),

a melhor forma de detectar tumores precoces hepáticos, é o rastreamento do CHC em pacientes cirróticos por meio de ecografia abdominal a cada seis meses.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2005) apresentou resultados de estudo epidemiológico sobre CHC, o qual caracteriza a população acometida no Brasil. Na sua maioria o grupo prevalente é de homens brancos, na 5ª década de vida, com história de tabagismo, alcoolismo e cirrose. O CHC é uma doença de alta mortalidade, razão pela qual é necessário que sejam desenvolvidos programas de prevenção ou de detecção precoce nas populações de risco, bem como, de estimular as pesquisas básicas para melhor entendimento da patogenia dessa doença.

O desenvolvimento do CHC é um processo complexo, associado ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que passa por estágios de iniciação, promoção e progressão (Cervello e Montalto, 2006). Inúmeras observações experimentais demonstraram que produtos virais podem contribuir para a transformação maligna dos hepatócitos.

Entender o CHC é muito complexo, pois a carcinogênese é caracterizada pelo processo de múltiplos estágios que envolve vários eventos celulares e moleculares, para transformar uma célula normal em uma célula neoplásica. Este processo compreende três momentos: iniciação, promoção e progressão.

Durante a iniciação, a célula normal é atacada por um agente biológico, físico ou químico genotóxico. Agentes genotóxicos podem promover a mutação na célula normal e gerar espécies ativas de oxigênio (EAO) em alta concentração. EAO são capazes de oxidar macromoléculas ou ativar fatores de transcrição. Além disso, a iniciação ocorrer concomitante com o desenvolvimento do processo inflamatório (Klaunig et al., 2010).

Enquanto que, a iniciação está associada a mutação celular e danos no DNA, a promoção está ligada à modulação da expressão do gene. Uma característica desta etapa é o aumento na divisão celular e a redução na apoptose, além de forte estímulo aos fatores de crescimento. A fase de promoção, normalmente, é caracterizada pela presença de lesões pré-cancerosas na análise anatomopatológica. Por último, a fase de progressão está associada aos fatores de crescimento ativados que podem favorecer a expansão clonal celular e contribuir para o crescimento do tumor. Esta fase já se observa lesões tumorais,

momento em que ocorre a transformação de lesões pré-cancerosas em células tumorais. Na fase de progressão as EAO contribuem para a expansão clonal, resistência a fármacos e crescimento desorganizado (Klaunig et al., 2010; Boonstra e Post, 2004).

Muitos estudos têm demonstrado a presença de excesso de produção de EAO em doenças hepáticas crônicas (Tieppo et al., 2009; Bona et al., 2012). A relação entre EAO e desenvolvimento de CHC tem sido amplamente discutida. O estresse oxidativo pode causar danos nos lípidios, nas proteínas e no DNA, produzindo a instabilidade do cromossoma, mutação genética e crescimento anormal de células (Dröge, 2002). Acredita-se que, reduzindo a geração de EAO, seria uma forma de retardar a progressão de tumor no fígado.

1.2 Estresse oxidativo na carcinogênese

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes em favor das oxidantes. Este desequilíbrio pode ser resultado do aumento exagerado na geração de EAO e de radicais livre (RL) e/ ou da redução da atividade de enzimas antioxidantes (Halliwell, 1989).

O organismo vivo utiliza oxigênio (O_2) para sobreviver e manter suas atividades metabólicas. O oxigênio é um elemento vital e também potencialmente nocivo para as células (Boveris e Chances, 1973). Em certas condições, o O_2 é responsável por reações químicas extremamente tóxicas.

Para converter o oxigênio molecular em água são necessários 4 elétrons, porém na cadeia eletrônica mitocondrial, os elétrons são doados de forma monovalente, permitindo a formação de espécies intermediárias. Então, nos organismos aeróbios, o O_2 é reduzido à água no final da respiração mitocondrial (Figura 1). A molécula de O_2 se mantém unida ao complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial até que ocorra a redução total do O_2 em água. Durante este processo, por receber apenas 1 elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do oxigênio, gerando ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Com a adição de um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 na presença de metais de transição forma o radical hidroxil ($\cdot OH$) (Thannickal e Fanburg, 2000).

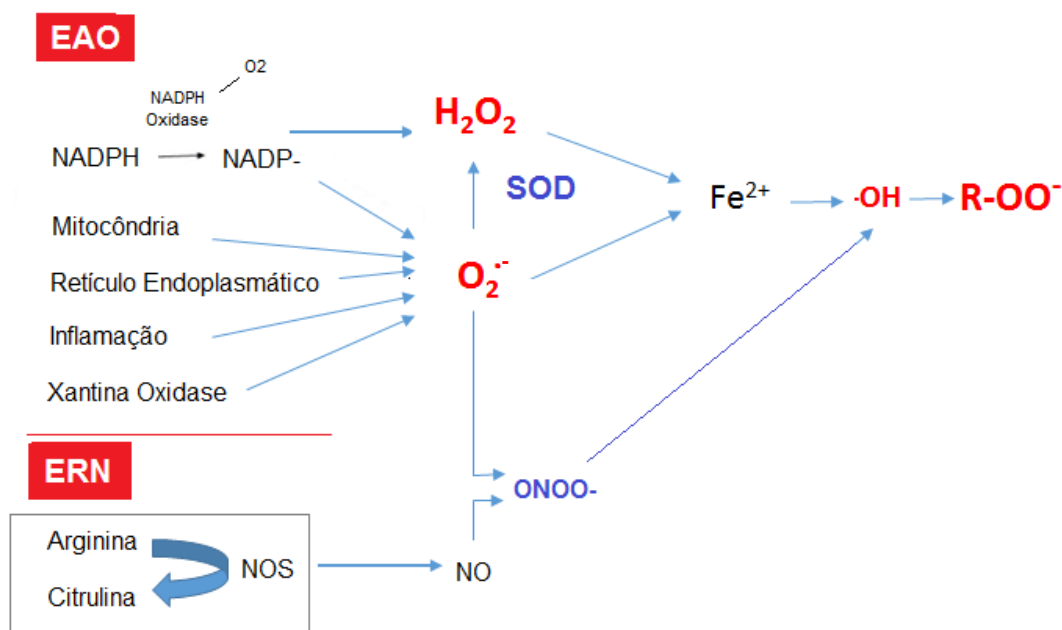


Figura 1: Esquema da geração das espécies ativas de oxigênio (EAO) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN). NADPH: fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo; O₂: oxigênio; O₂^{•-}: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; SOD: superóxido de dismutase; ONOO•: peroxinitrito; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; Fe²⁺: íon ferro; OH•: radical hidroxil, R-OO•: radical peróxil (fonte: do autor).

As espécies oxidantes são conhecidas como espécies ativas de oxigênio (EAO) e incluem o ânion superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxil (•OH), o radical peróxil (ROO•) e o alcóxil (RO•), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion hipoclorito (OCl⁻) e oxigênio *singlet* (¹O₂) (Barp et al., 2002). O óxido nítrico também gera espécies reativas, tais como NO•. Quando o NO se combinar com as EAO potencializa o estresse oxidativo, pois formam o peroxinitrito (ONOO•), esta forma é muito reativa e danosa à célula (Halliwell, 1989). Além das espécies ativas, existem outro grupo de espécies que podem oxidar moléculas biológicas, este grupo é denominado de radicais livres. Os radicais livres apresentam o último orbital desemparelhado, devido a isto, possuem alta reatividade e capacidade de reagir com outras moléculas.

Os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser a lipoperoxidação (LPO), a inativação enzimática, a alteração do estado redox intracelular e o dano no DNA (Favier et al., 1995). Quando um radical reage com proteínas da membrana celular,

ocasiona dano estrutural e funcional. Ao reagir com DNA e proteínas permite ativar ou inativar enzimas envolvidas na carcinogênese, bem como, ativar fatores de transcrição pró-tumorais. Neste contexto, a geração de EAO e RL contribui com um ambiente favorável aos múltiplos processos que envolve o crescimento tumoral (Klaunig et al., 2010).

As EAO podem atacar o DNA ocasionando mutações, transformações neoplásicas, perdas das funções celulares reguladoras e apoptose (Vuillaume, 1987; Berlett e Stadtman, 1997). Podem ser citadas quatro vias em que o DNA sofre mutações decorrente ao dano oxidativo: i) alterações nas pontes de hidrogênio, modificando a estrutura química dos nucleotídeos do DNA; ii) aumento nas *zonas quentes* de polimerase; iii) alterações na conformação do DNA; iiiii) indução de um DNA polimerase predisposto ao erro (Henle e Linn, 1997).

Na fase de iniciação, oxidações dependentes de hidroperóxidos, permitem a formação de adutos de DNA que pode ser reparados ou não. Quando não reparados, resultam em mutação. Este processo, por não afetar a síntese do DNA, permite o crescimento da célula com mutação (Hardeland, 2005).

A superprodução de EAO e RL, associada a precária resposta das defesas antioxidante, pode ser responsável pelo dano oxidativo de macromoléculas. Exemplo desta condição, é a exposição crônica e intermitente a químicos carcinogênicos, que provocam dano oxidativo ao DNA, alquilando a guanina, que por sua vez resultará em mutação e subsequentemente expansão clonal da célula mutada. Dröge (2002), relata que as EAO podem potencializar os processos carcinogênicos, porque elas favorecem a mutagenicidade, promovem o tumor e sua progressão. As EAO podem estimular as vias de transdução de sinal e levar à ativação de fatores chave de transcrição como fator nuclear eritroide-2 (Nrf2) e NF κ B, favorecendo à carcinogênese (Klaunig et al., 2010).

O papel do estresse oxidativo se sustenta na correlação entre a indução de tumores e consumo ou exposição a altas concentrações de metais de transição, que facilita a produção de radicais livres. As EAO estão associadas a ativação metabólica procarcinogênica permitindo a iniciação, promoção e progressão tumoral (Wang et al., 2006).

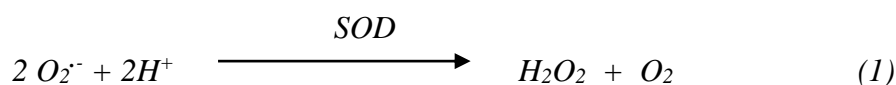
1.3 Defesas antioxidantes: sistema enzimático e não enzimático

Os RL só são eliminados do organismo quando reagem com outro radical ou com o sistema antioxidante. Os antioxidantes agem de várias formas, inativando as EAO ou se ligando aos íons metais de transição. Conforme a forma de atuação, são classificados em antioxidantes primários, secundários e terciários. Os antioxidantes primários: previnem a formação de novos RL. Representam este grupo, a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e as proteínas de união com metais (ferritina e ceruloplasmina). Os antioxidantes secundários: captam os radicais, evitando as reações em cadeia. Entram neste grupo: a vitamina E, a vitamina C, o ácido úrico e a albumina. Os antioxidantes terciários reparam moléculas lesadas por radicais, como por exemplo, enzima reparadora de DNA (Cheeseman e Slater, 1993).

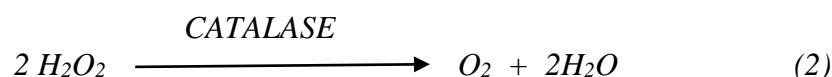
O sistema de defesa antioxidante pode ser de origem enzimática ou não-enzimática. As defesas enzimáticas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione dissulfeto redutase (GR) e glutathione S transferase (GST) (Travacio e Llesuy, 1996). As defesas antioxidantes não enzimáticas são compreendidas pelas vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico), glutathione e flavonoides (Koul, Bhatia e Bansal, 2001).

O sistema antioxidante enzimático é responsável pela manutenção do equilíbrio entre substâncias pró-oxidante e antioxidante, que muitas vezes o organismo fica exposto. Cada enzima deste sistema desempenha um papel específico no controle do balanço oxidativo.

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 . Apresenta-se em três formas: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a Cu-ZnSOD situada no endotélio vascular e, por último, a SOD-manganês, presente na matriz mitocondrial (Chance et al., 1979). Na reação 1 está expressa a ação catalítica da SOD junto ao ânion superóxido.



O produto final da dismutação é o peróxido de hidrogênio e o O_2 . O H_2O_2 , apesar de não ser um radical, facilmente reage originando o radical hidroxil. A remoção dos peróxidos ocorre por meio da CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto que a glutaciona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Travacio e Llesuy, 1996). A ação da catalase sobre o peróxido é apresentada na reação 2.



A GPx também atua sobre peróxidos e está situada no citosol e na matriz mitocondrial e, reduz o peróxido de hidrogênio à água, através da oxidação da glutaciona reduzida (GSH). Para restabelecer a glutaciona oxidada (GSSG) à reduzida, é necessário que a Glutaciona Redutase (GR) promova a regeneração da GSSG, consumindo NADPH, conforme demonstrado na Figura 2 (Halliwell, 1989).

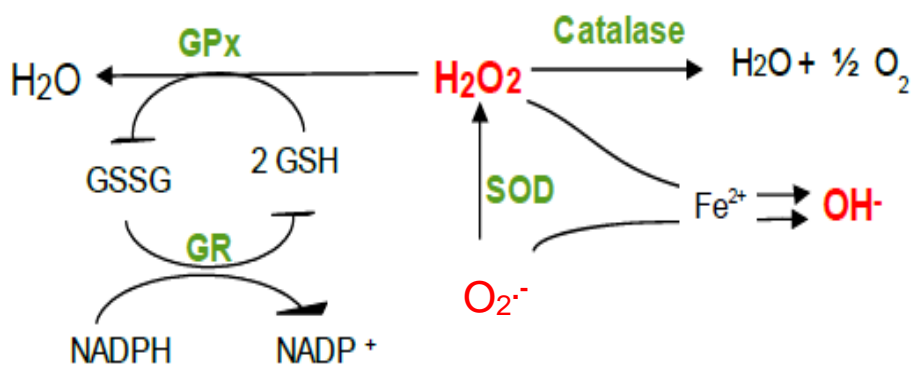


Figura 2: Sistema de defesa antioxidante e a interação entre as enzimas. H_2O : água; GPx: Glutaciona Peroxidase; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; O_2 : oxigênio; GSSG: Glutaciona oxidada; GSH: Glutaciona reduzida; GR: Glutaciona Redutase; SOD: Superóxido de dismutase NADPH: fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo; Fe^{2+} : íon ferro; OH^{\cdot} : radical hidroxil (fonte autor).

Além das defesas enzimáticas, o estresse oxidativo pode ser controlado com a suplementação de substâncias que atuam como antioxidantes. Dentre elas estão vitaminas

(α -tocoferol ou vitamina E, β -caroteno, ácido ascórbico ou vitamina C), glutathione, flavonoides e melatonina (MEL) (Tieppo et al., 2009; Bona et al., 2012). A melatonina se destaca por ter ação antioxidante, anti-inflamatória e propriedades oncostáticas (Reiter et al., 2007).

1.4 Melatonina: características e ações sobre a sinalização celular

O estresse oxidativo desempenha um papel central na patogênese e progressão de doenças hepáticas e o uso de antioxidantes tem sido proposto como terapia alternativa, bem como, drogas coadjuvantes, para compensar os danos sistêmicos e hepáticos (Moreira et al., 2004; Tieppo et al., 2009; Bona et al., 2012).

A melatonina (MEL) – N-acetil-5-metoxitriptamina, é uma indolamina lipofílica, derivada do triptofano e produzida, principalmente, pela glândula pineal dos vertebrados (Reiter e Tan, 2002; Reiter et al., 2007). A utilização da MEL está relacionada ao controle e tratamento de alterações ligadas ao ritmo circadiano (Kostoglou-Athanassiou, 2013; Perdomo et al., 2013) ao ritmo do sono, ao humor, à maturação sexual e reprodução, à função imunitária, ao envelhecimento e ao sistema de defesa antioxidante (Mills et al., 2005, Allegra et al., 2003, Reiter et al., 2001; Perdomo et al., 2013).

Muitos estudos vêm demonstrando as inúmeras ações que a melatonina é capaz de realizar, entre elas: atividade anti-angiogênica (Lissoni et al., 2001), atividade anti-inflamatória (Lissoni et al., 1997), imunestimulação (Brzezinski et al., 1997, Lissoni et al., 2002), antioxidante (Reiter et al., 2004) e oncostática (Mills et al., 2005; Reiter et al., 2007, Blask et al., 2002). Os efeitos oncostáticos foram descritos pela primeira vez por Blask et al. (2002), e atualmente, são amplamente estudados, principalmente em tumores de mama, cólon e ovário (Shiu et al., 2003, Mills et al., 2005; Otolora et al., 2008; Jung et al., 2010; Carbajo-Pescador et al., 2011).

Nos estudos em que a ação da melatonina foi comparada com a de outros antioxidantes conhecidos, como por exemplo, as vitaminas C e E, a melatonina mostrou-se mais eficiente na redução do estresse oxidativo/ nitrosativo (Reiter et al., 2001; Reiter et al., 2003). As características que conferem à MEL uma eficiente ação antioxidante, baseia-se na sua capacidade direta de atuar como um doador de elétrons em processos não enzimáticos (Figura 3), na capacidade de atravessar facilmente barreiras

morfofisiológicas e pelo seu acesso rápido a locais de produção de radicais livres, por exemplo, nas mitocôndrias, onde a geração de radicais livres é especialmente elevada (Reiter et al., 2001; Reiter et al., 2003). Indiretamente a MEL age sobre os radicais livres, através da estimulação de várias enzimas antioxidantes e por ação de seus metabólitos, que também atuam como varredores de RL (Reiter et al., 2003).

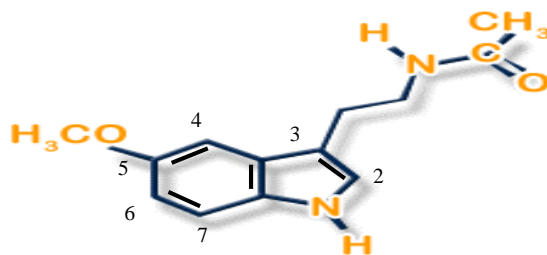


Figura 3: A estrutura química da Melatonina. Esta indolamina tem peso molecular de 232,27 g/mol, característica química de anfifilicidade, que permite difundir-se em meio hidrofílico e lipofílico. Isto ocorre devido ao grupamento metoxi no carbono 5 e grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina. A propriedade antioxidante se deve a dupla ligação presente nos carbonos 2 e 3 (do anel pirrólico) que possuem alta capacidade de doar elétrons (Cipolla-Neto e Afeche, 2008).

Em adição à atuação da MEL frente aos RL seja via direta ou indireta, a melatonina também exibe significativa atividade anti-inflamatória (Mauriz et al., 2013; Perdomo et al., 2013). A eficácia da melatonina como agente anti-inflamatório resulta da sua capacidade em reduzir a expressão e atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da ciclo-oxigenase (COX-2), limitando assim a produção de uma variedade de moléculas pró- inflamatórias (Perdomo, et al., 2013). A melatonina modula a produção destes fatores através da regulação de vários fatores de transcrição, incluindo NF κ B, o fator nuclear eritróide-2 (Nrf2) e o fator induzível por hipóxia (HIF) (Mauriz et al., 2013; Carbajo-Pescador et al., 2013; Vriend e Reiter et al., 2015).

O fator de transcrição NF κ B induz a expressão de muitos genes que atuam na regulação da resposta imune, inflamatória e apoptótica. Porém, a ativação exagerada deste fator pode ser a causa primária de muitas doenças. Há evidências de que o fator NF κ B pode ser modulado pela melatonina (Bauerle e Henkel, 1994). De forma semelhante, o fator AP-1, que regula a expressão de genes associados com o crescimento celular,

também pode ser regulado por esta indolamina. A regulação destes fatores nucleares pode resultar no controle na produção de citocinas pró-inflamatórias. A melatonina contribui com as defesas antioxidantes das células através da regulação gênica, isto porque os promotores de enzimas antioxidantes são regulados de forma direta ou indireta por fatores nucleares, os quais podem ser regulados por este hormônio (Cuzzocrea e Reiter, 2002; Mauriz et al., 2013; Hill 1988; Papazisis et al., 1999; Petranka et al., 1999; Fariol et al., 2000).

Os genes do citocromo P450 são tipicamente genes com elementos responsivos a antioxidantes (ARE) em seus promotores. Por possuírem ARE, as enzimas citocromo P450 podem ser reguladas, em parte, pela ativação do Nrf2, após liberação do seu inibidor *Kelch-like ECH associated protein 1* (Keap-1). Esta ativação é importante para a transcrição das enzimas antioxidantes (Venugopal e Jaiswal, 1996; Tripathi e Jena, 2010).

A melatonina tem capacidade de ativar o Nrf2, translocando-o para o núcleo. Devido a isto, é possível que sistemas biológicos expostos à melatonina obtenham altos níveis de enzimas detoxificantes da fase I, tornando-os mais preparados para situações de estresse oxidativo ou situações de toxicidade.

Estudos experimentais têm documentado que a melatonina é capaz de aumentar a ativação de Nrf2 e a expressão de enzimas detoxificantes Heme oxigenase 1 (HO-1) e NAD(P) quinona oxidoreductase-1 (NQ1) (Tripathi e Jena, 2010). Escames et al., (2006) destacam que a melatonina possui ação neuroprotetora, cardioprotetora e anticarcinogênica.

Apesar da melatonina atuar como antiapoptótica em doenças inflamatórias hepáticas. Alguns estudos “*in vitro*”, utilizando a melatonina em células tumorais, demonstraram que ela apresenta uma ação pró-apoptótica, controlando o crescimento tumoral (Martin-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2013, 2013a). De forma curiosa, parece que a melatonina atua de forma oposta em células normais e em células tumorais (Sainz et al., 2003). Esta dualidade permite que ela seja um bom recurso terapêutico no carcinoma hepatocelular (CHC), porque exerce influência nos mecanismos que regulam o estresse celular e oxidativo, sendo capaz de estimular e de inibir inúmeras rotas moleculares. Esta ação regulatória torna a melatonina um interessante agente terapêutico na carcinogênese.

1.5 Vias de sinalização celular e suas relações durante a carcinogênese

1.5.1 Fator de Transcrição Nuclear Kappa B ($NF_{\kappa}B$)

O $NF_{\kappa}B$ é importante sinalizador da resposta inflamatória e, quando ativado, transloca-se para o núcleo (Figura 4), onde se liga a região promotora de genes alvos e estimula a expressão de genes de moléculas de adesão e de mediadores inflamatórios (Thanos e Maniatis, 1995; Bakkar e Guttridge, 2010). A forma do fator de transcrição $NF_{\kappa}B$ é definida por um complexo dímero da família de polipeptídeos da família Rel/ $NF_{\kappa}B$, que se divide em duas classes: a primeira consiste de proteínas precursoras p105 e p100, que são processadas e maturadas nas formas de p50 e p52, respectivamente. A segunda classe é representada pelas proteínas do tipo Rel (c-Rel), v-Rel, Rel A (p65) e Rel B (Siebenlist, Franzoso e Brown, 1994).

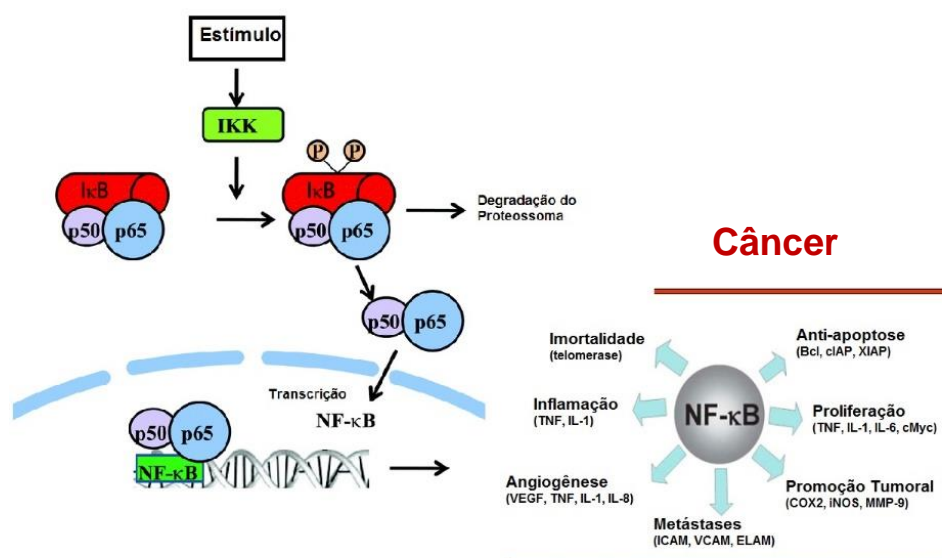


Figura 4: Ativação do $NF_{\kappa}B$ e suas ações sobre a inflamação e o câncer (Adaptado de Tabrunyn e Griffion, 2008; Walston, 2015).

Este fator apresenta por característica a rápida translocação do citoplasma para o núcleo em resposta a um sinal extracelular. O fator encontra-se inativado no citoplasma, devido a ligação a uma proteína inibitória $I_{\kappa}B$, e nesta condição não pode estimular outras células. Porém muitos sinais inativam o inibidor $I_{\kappa}B$, permitindo que o $NF_{\kappa}B$ entre para

o núcleo e rapidamente passe a induzir a transcrição nuclear (Siebenlist, Franzoso e Brown, 1994).

O entendimento das vias utilizadas para sinalizar o fator nuclear ainda é motivo de estudo, já que existem muitos pontos obscuros. Muitos sinais de transdução têm sido implicados na ativação do NF κ B, capazes de iniciar a cascata de fosforilação. O sítio da proteína quinase (PKA) é conservada entre os membros da família Rel/ NF κ B, com exceção da Rel B e p52 (Bours et al., 1992).

As vias de sinalização citoplasma-núcleo são extremamente complexas, observadas na figura 5. Para ativar as respostas de fatores nucleares são necessárias várias estruturas e processos celulares, tais como estímulo transmembrana, receptores, proteína quinase, 2º mensageiros, processos de fosforilação e proteínas citoplasmáticas. A fosforilação da subunidade NF κ B pode afetar funções importantes, como a ativação da transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios e de sobrevivência celular. Os sinais que ativam o NF κ B são originados por estímulos decorrentes de: citocinas, sinais mitogênicos, mediadores biológicos, produtos bacterianos, produtos virais, estresse físico, estresse oxidativo e agentes químicos (Siebenlist, Franzoso e Brown, 1994) (Figura 5).

Existem evidências que sugerem que as EAO possam atuar como sinalizadores ao NF κ B. Isto está baseado na modulação da função do fator nuclear κ B, quando utilizado algum antioxidante. Este fato demonstra que, o NF κ B é um fator de transcrição responsivo ao estresse oxidativo (Van Den Berg et al., 2001).

Em função de sua resposta a sinais de agentes agressores, de sua ligação a fatores de crescimento e de sua associação a proteínas envolvendo crescimento irregular é sugerido ao NF κ B um papel patofisiológico, levando a pensar que sua modulação poderia ter efeitos benéficos na supressão das respostas imediatas da inflamação na fase aguda (Baeuerle e Henkel, 1994).

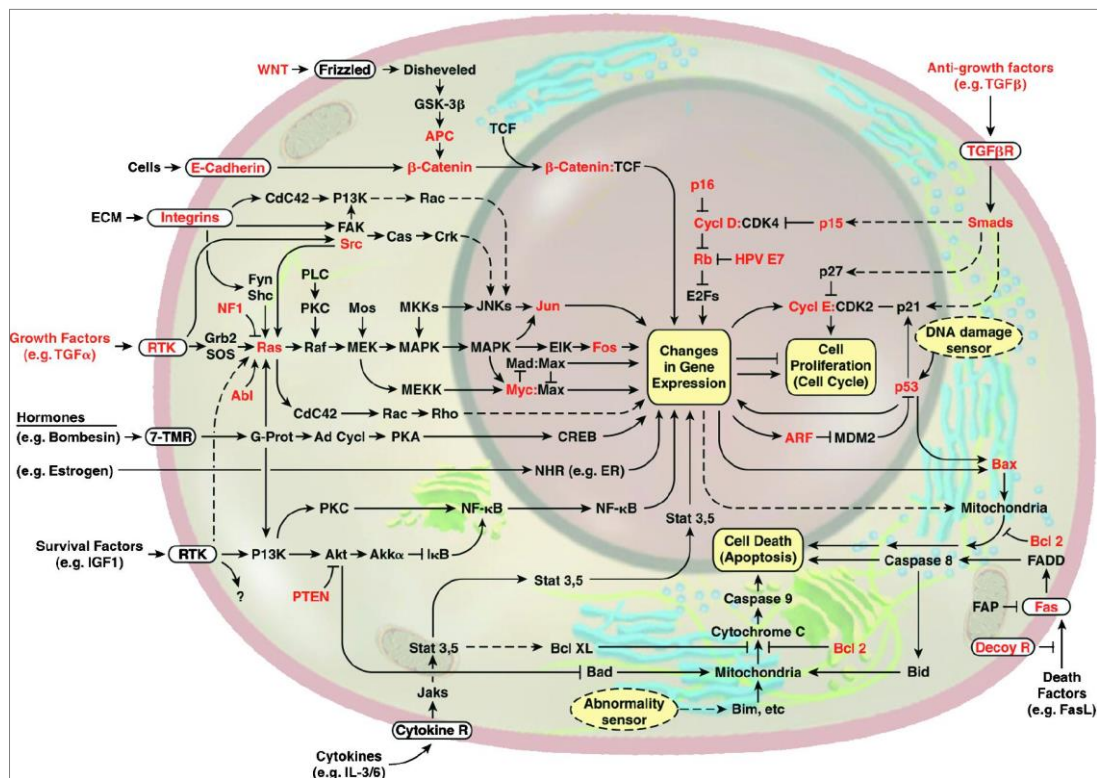


Figura 5. Esquema das complexas vias do receptor de membrana e das cascatas de sinalizações que ocorrem no citoplasma e núcleo celular. Salienta-se a presença do NF κ B acionado por fosfoinositol 3 quinase (PI3K) e proteína quinase c (PKC) (Hanahan e Weinberg, 2000).

1.5.2 Estresse de retículo e apoptose na carcinogênese

Recentemente a interação entre o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e o estresse de retículo está sendo citada na literatura como base para explicar os processos saúde-doença. O entendimento da interação entre estes três processos é essencial para elucidar a patogenia de muitas doenças. Há evidências que o estresse oxidativo/ resposta inflamatória/ estresse do retículo endoplasmático estão interligados e formam um ciclo retroalimentado. E que, ações sobre qualquer um deles, afetará os demais (Zhang, Kaufman, 2008).

O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pelo processo de "folding" da proteína ou enovelamento da proteína, fenômeno pelo qual a proteína dobra-se sobre si mesma e torna-se ativa. Também, o RE responde pela síntese de lipídios e esteroides, e está envolvido no sistema de controle de alta qualidade que garante correto

processo de enovelamento de proteínas, as quais serão transportadas para o complexo de Golgi.

Contudo, estados fisiológicos ou patofisiológicos, que aumentam a demanda do processo enovelamento de proteínas ou que estimulam a ruptura nas reações proteicas, geram desequilíbrio entre preparar o processo de enovelamento e a capacidade do RE. Isso causa acúmulo e desordem no processo de enovelamento proteico (denominado de *unfolded*), no lúmen do RE. Tal situação é denominada de estresse do retículo endoplasmático. O estresse do RE aciona processo de desativação proteica - UPR (do inglês *unfolded protein response*) (Csordás e Hajnóczky, 2009).

A inflamação, pelo excesso de mediadores químicos e seus metabólicos, agravam o estresse de RE. Curiosamente, em muitos processos patológicos, estes metabólicos, também podem atuar como alvos para desencadear estresse oxidativo (Zhang, Kaufman, 2008; Hotamisligil, 2010). Além dos metabólicos, salienta-se que a sinalização por Ca^{+2} intracelular e radicais livres são as chaves para a interação entre estresse RE, estresse oxidativo e inflamação (Csordás e Hajnóczky, 2009).

O retículo endoplasmático possui um ambiente oxidativo que facilita a formação de pontes dissulfídicas nas proteínas em maturação permitindo a estabilização da estrutura protéica. As proteínas entram no retículo como cadeias polipeptídicas não dobradas e dobram-se no lúmen do retículo. O dobramento é facilitado pelas chaperonas. As chaperonas promovem o dobramento por meio de ciclos de ligação e liberação do substrato regulado pela hidrólise do ATP em ADP.

A presença do estresse no retículo é detectada por três proteínas transmembranosas (Figura 6): *PERK* (*PKR-like ER kinase*), *ATF6* (*Activating transcription factor*) e *IRE-1* (*Inositol-requiring enzyme-1*). Sob condições de estresse, estas proteínas iniciam diferentes mecanismos de regulação (Zhang, 2008).

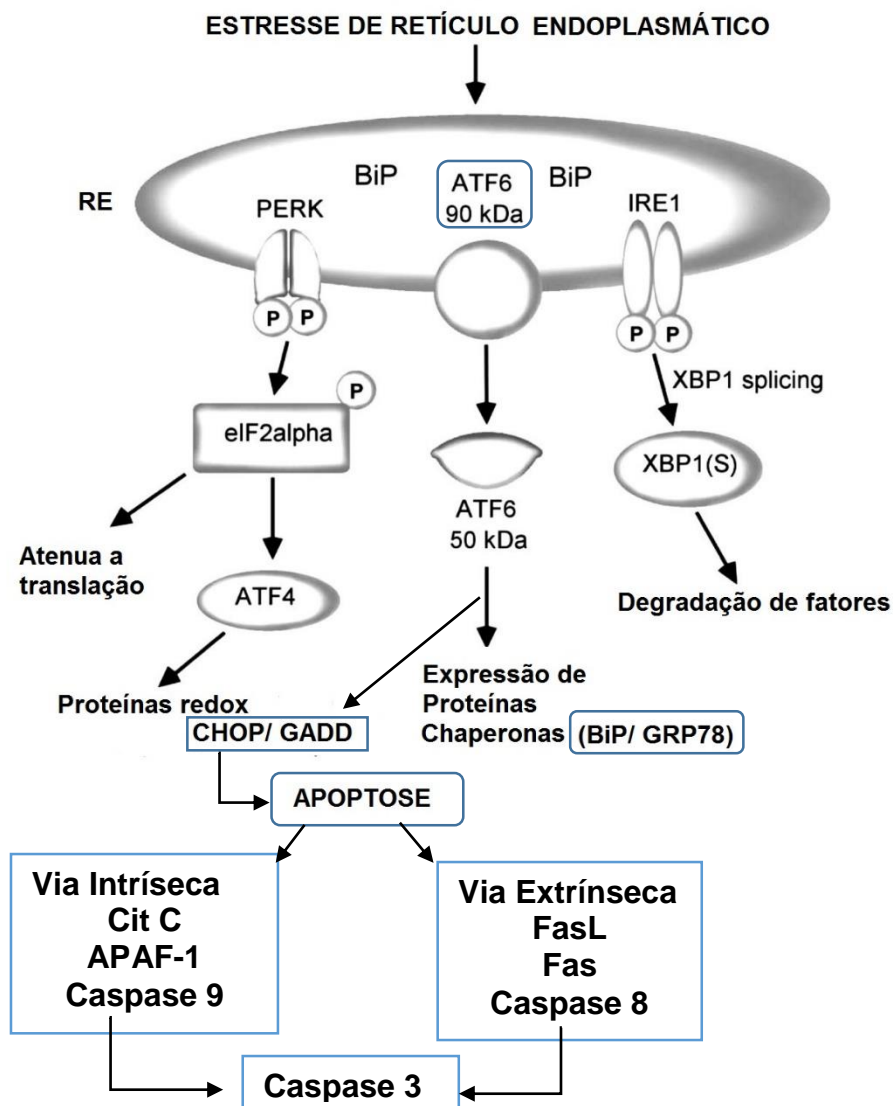


Figura 6: Esquema da ativação das proteínas envolvidas no estresse de retículo em associação à apoptose (Adaptada de Isler, Skalet e Alwine, 2005).

A PERK é uma proteína serina/treonina quinase transmembrana que após sofrer oligomerização e auto-fosforilação, fosforila a subunidade alfa do fator de iniciação de tradução 2 (eIF2 α), o que resulta na diminuição da tradução da maioria dos mRNA (Boyce et al., 2005). No entanto, há uma tradução seletiva do mRNA de ATF4 (*activating transcription factor 4*). O ATF4 requer a fosforilação do eIF2 α para sua tradução e é essencial para induzir a transcrição da molécula GADD34 (*growth-arrest DNA-damage gene 34*). GADD34 é uma proteína citosólica, que se associa a proteína fosfatase 1 (PP1),

que por sua vez desfosforila eIF2 α e promove o recomeço da síntese protéica. O ATF4 também induz a síntese do fator CHOP (*C/EBP homologous protein*), um fator de transcrição que está relacionado a apoptose caso as células sejam expostas a um estresse crônico do RE (Hotamisligil, 2010).

O ATF6 é um fator de transcrição que após o desligamento da BiP do seu domínio luminal, vai até o Complexo de Golgi e sofre clivagem proteolítica pelas proteases sítio 1 e sítio 2 (S1P e S2P). O fragmento gerado, ATF6f, vai até o núcleo e induz a expressão de vários genes da via UPR (Zhang et al., 2006).

Depois de se desligar da BiP, a IRE-1 sofre oligomerização e autofosforilação, ativa o seu domínio endonuclease que faz a clivagem sítio-específica do mRNA de XBP1, produzindo um mRNA de XBP1 processado (*spliced, sXBP1*) que gera uma proteína com domínio C-terminal de 226 aminoácidos (Yoshida et al., 2000). A IRE-1 também pode induzir a apoptose uma vez que recruta e ativa a caspase 12 (Nakagawa et al., 2012; Chen et al., 2014).

O XBP-1 apresenta as formas processada (*spliced*) e não-processada (*unspliced*). A presença da forma *spliced* de XBP-1 representa a ativação da via UPR, sendo considerado o principal fator de transcrição responsável pela indução da expressão genes alvos da via UPR (Yoshida et al., 2000). Ele ativa a transcrição de chaperonas (BiP/GRP78, GRP94, Calnexina, ERdj3, ERdj4) e induz a transcrição de outros genes relacionados a degradação de proteínas (EDEMs) (Yoshida et al., 2000).

Danos celulares, como lesão no hepatócito e seu contínuo “*turnover*”, são essenciais para a proliferação de células hepáticas malignas. A necessidade constante da célula em realizar “*turnover*” também contribuem para a formação do carcinoma hepatocelular, uma vez que células mortas estimulam a mitogênese de hepatócitos (Malhi e Kaufman, 2011).

A morte celular é crucial para o desenvolvimento da malignidade. Isso pode ser explicado pela ação do fator de transcrição kB pela subunidade p53, que regula o ciclo celular, assim como a morte celular. A perda da função ou defeito na subunidade p53, por mutação ou inativação, pode estar associada à presença de tumores malignos (Melino, 2010).

Os mecanismos presentes na formação do tumor são extremamente complexos e muitos atores estão envolvidos (Figura 7). Este processo associa inflamação crônica, atividade oxidativa ativada, angiogênese, fatores de crescimento, fatores nucleares, e por fim alterações gênicas.

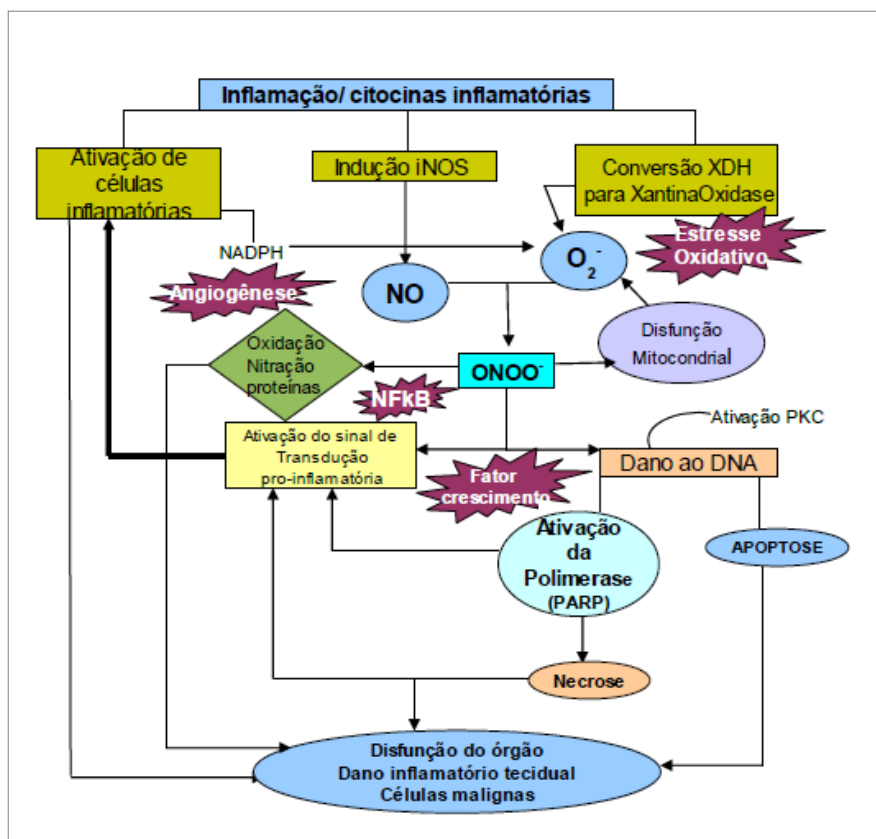


Figura 7: Relação entre o desenvolvimento do processo de doença crônica inflamatória com alterações celulares malignas. Estabelecendo as respostas ao estresse oxidativo, ao fator nuclear kB, a formação de angiogênese, a ativação de rotas inflamatórias e proliferativas (fatores de crescimento), apoptose e disfunção tecidual (Fonte: autor).

Outro aspecto importante na carcinogênese é a apoptose. Conceituada como processo programado que leva a morte celular. Quando a célula sofre uma injúria, desencadeia processo de necrose, cujos sinais são conhecidos como perda da capacidade de regulação osmótica, ruptura da membrana e conseqüentemente saída do conteúdo intracelular. Isto por fim, resulta em processo de fagocitose dos restos celulares, acrescido de resposta inflamatória. Enquanto que, a apoptose é um processo fisiológico, com controle genético, cujas as células envelhecidas ou mal formadas são destruídas. Este processo é considerado antagonista do ciclo celular de proliferação (Elmore, 2007).

A apoptose pode apresentar períodos de redução de sua atividade de forma fisiológica ao longo da vida, como durante o período embrionário. Entretanto, a redução em algumas situações pode sinalizar distúrbios, como doenças tumorais, auto-imunes, infecciosas e virais (Elmore, 2007).

Células tumorais apresentam características de resistência à apoptose pela super expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como a família Bcl-2 ou pela inibição de proteínas pró-apoptóticas (Bax) (Hanahan e Weinberg, 2011). As caspases são capazes de reconhecer substratos com resíduos de aspartato e sinalizar para a apoptose, condensando e fragmentando o núcleo, para posteriormente ser fagocitado. Das 14 caspases, apenas seis participam da apoptose (caspase 3, 6, 7, 8, 9, 10). A caspase cliva a proteína ligada ao p53, liberando-o para que seja translocado ao núcleo e assim passe a transcrever o gene pró-apoptótico Bax. A apoptose é ativada de duas maneiras, pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Figuras 6 e 8). A via extrínseca ativa a caspase 3, por meio de FasL-Fas que aciona a caspase 8. A via intrínseca é iniciada pela liberação de citocromo C, que se liga a APAF-1, e aciona a caspase 9, para finalmente, ativar a caspase 3 (Nicholson e Thornberry, 1997).

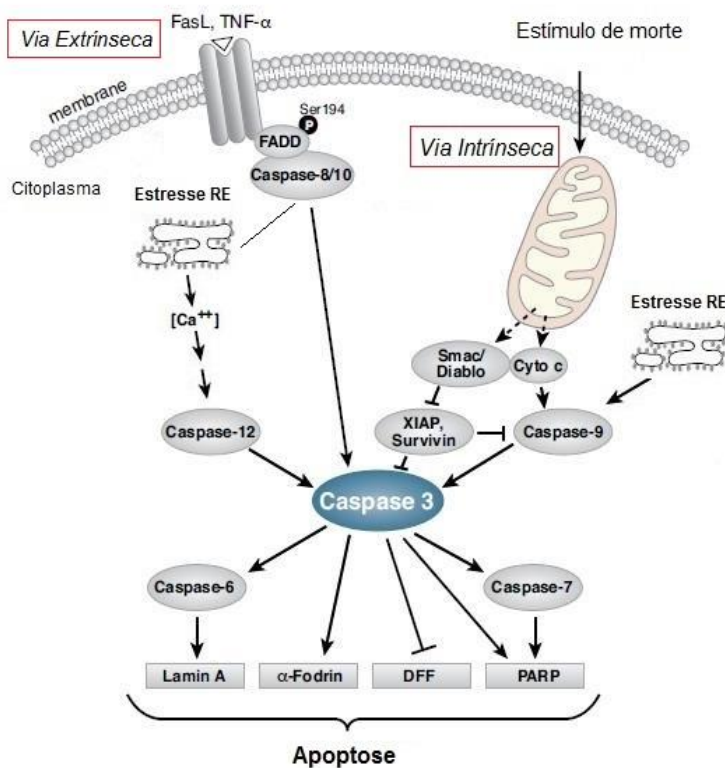


Figura 8: vias da apoptose ativando a caspase 3 (Adaptada de Nicholson e Thornberry, 1997).

Fortes evidências sugerem que a perda ou a falência deste sistema regulatório pode contribuir para o agravamento de inúmeras formas de câncer (Hanahan e Weinberg, 2011).

1.6 Modelos experimentais de carcinogênese hepática

Muitos modelos experimentais, que mimetizam o desenvolvimento da carcinogênese do fígado, foram descritos ao longo de 60 anos de história. No decorrer destas décadas muitas hipóteses sobre os mecanismos carcinogênicos hepático foram formuladas. Dentre elas destaca-se a concepção que o desenvolvimento do CHC passa por estágios de iniciação, promoção e progressão (Fausto e Campbell, 2010).

São citadas na literatura 4 grandes linhas de modelos experimentais: cirúrgico, por implante de células tumorais, por manipulação genética e por indução química.

Os modelos por implante de células tumorais são considerados rápidos para o crescimento da neoplasia, porém são sofisticados, caros e necessitam domínio tecnológico. Além do mais, são comumente associados a modelos por indução química, para recriar um ambiente de fibrose no fígado (Heindryckx et al., 2009).

Os modelos experimentais de CHC por manipulação genética utilizam animais geneticamente modificados, como, camundongos transgênicos ou nocautes, genes com expressão viral, supressores tumorais, oncogenes, fatores de crescimento de insulina (IGF), epidermal (EGF) e de hepatócitos (HGF) inibidos ou hiperestimulados (Newell et al, 2008; Heindryckx et al., 2009; Fausto e Campbell, 2010). Este modelo é muito utilizado para estudar rota molecular específica, e normalmente é associado à indução química ou ao implante de células tumorais.

No grupo de modelos de CHC por indução química estão aqueles que expõe os animais a agentes químicos genotóxicos/ carcinogênicos. Dentre eles podem ser citados: dieta com redução de etionina, uso de proliferador de peroxissoma sintético, tioacetamida (TAA) e dietilnitrosamina (DEN).

Estes modelos seguem a primícia de usar doses de composto carcinogênico e esperar o tempo de latência. Há dois tipos de compostos carcinogênicos (Pitot e Dragon, 1991):

- *Composto genotóxico*: tem capacidade de induzir alterações estruturais no DNA;
- *Composto promotor*: tem baixa capacidade genotóxica direta, mas reforça a formação do tumor após sua iniciação pelo composto genotóxico primário.

Uma das grandes vantagens dos modelos químicos é o de mimetizar as fases de evolução do CHC, reproduzir o ciclo lesão-fibrose-cirrose-malignidade, permitindo estudar cada fase do ciclo de formação do carcinoma hepático (Heindryckx et al., 2009).

Após revisão bibliográfica sobre modelos experimentais para CHC foi constatada imensa quantidade de protocolos, muitos de custo elevado, de difícil reprodução, pela falta de clareza dos protocolos, muitas adaptações de um trabalho para outro, alta taxa de mortalidade, longo tempo de latência para desenvolvimento da doença, além de não fornecer todas as etapas de desenvolvimento do câncer hepático.

Na falta de modelo experimental de CHC padronizado e cuidadosamente descrito surge a necessidade de propor a caracterização de um modelo experimental para CHC. O estabelecimento deste modelo se faz necessário para ampliar o conhecimento da sua patogênese. Estudar os mecanismos que regulam o desenvolvimento do tumor, detectar as vias que permita a transformação dos hepatócitos, avaliar a sequência da evolução da doença, em condições controladas, e eventualmente propor estudos com drogas, verificar sua resposta, efeitos e eficácia são objetivos que um bom modelo experimental deve atender.

Caracterizar um modelo experimental requer extremo cuidado na documentação dos resultados e sua interpretação. O modelo animal experimental precisa reproduzir as condições clínicas do CHC. Segundo Terblanche e Hickman, (1991) o modelo ideal deve atender uma série de requisitos:

- *Ser reversível*: o modelo deve produzir o CHC e permitir a sobrevivência dos animais até o final do processo.
- *Reproduzir*: a clínica, a extensão da lesão hepática e permitir sua avaliação.
- *Ser reproduzido*: quando seguidas as etapas do desenho experimental poder reproduzir o CHC.
- *A morte*: deve condizer com o CHC. A morte dos animais deve ser resultado direto do dano causado pelo tumor.

- Ter “*janela*” terapêutica: dispor de tempo suficiente que permita a investigação e o tratamento entre o período em que a lesão se desenvolve e a morte dos animais;
- *Animal adequado*: que permita o manuseio e o desenvolvimento da doença;
- *Baixo Risco ao pesquisador*

No intuito de estabelecer um modelo experimental de CHC esse estudo utilizou a indução do carcinoma por meio de agente químico indutor em associação de outro agente promotor, ou seja, os compostos genotóxicos utilizados foram: dietilnitrosamina (DEN) e acetilaminofluoreno 2 (2-AAF).

1.6.1 Modelo experimental de CHC por indução química

A dietilnitrosamina é um agente químico frequentemente usado como carcinógeno, podendo desenvolver tumor no fígado, trato gastrointestinal (Binoto et al., 2008), pele e pulmão (Wang et al., 1992). A capacidade carcinogênica da DEN é caracterizada por dano na estrutura do DNA. Conforme Verna et al., (1996), o DEN é hidrolizado para α -hidroxilnitrosamina. Esta bioativação é dependente de oxigênio e de NADPH e é mediada pelo Citocromo P450. Os agentes carcinogênicos podem formar adutos por metilação, etilação ou alquilação. A biotransformação do DEN forma o íon etildiazonium, que apresenta características eletrofílicas. Este íon é responsável pelos danos no DNA por reagir com nucleotídeos (Figura 9).

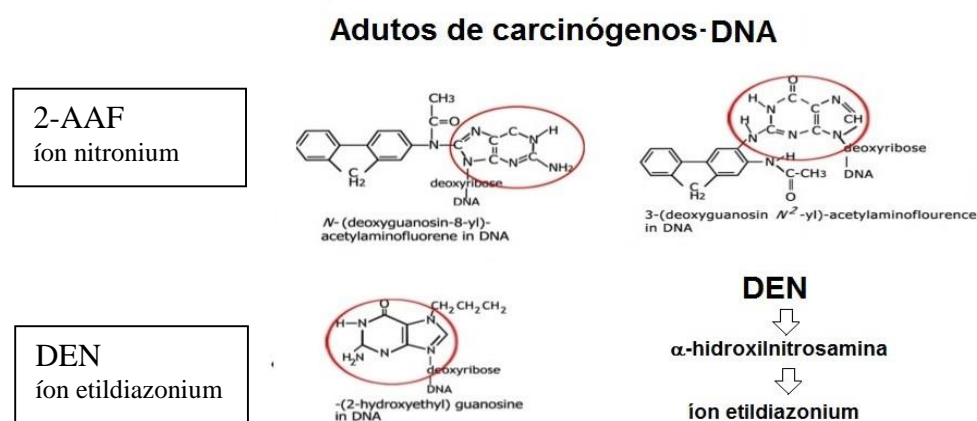


Figura 9: Formação de Adutos no DNA causados pelos carcinógenos DEN e 2-AAF. Em destaque a base nitrogenada, guanina, a qual reage com os radicais formados (Adaptado de Kensler, 2008).

A N-hidroxilação da 2-AAF seguida por esterificação do grupo N-hidroxilo dá origem a um composto altamente reativo (íon nitronium) capaz de uma reação não enzimática com locais nucleofílicos das proteínas e ácidos nucleicos. Qi et al., (2008) referem que o DEN potencializa o estresse oxidativo, que contribui para a hepatocarcinogênese. A ativação do sistema citocromo p450 aumenta a geração de espécies ativas de oxigênio (EAO), principalmente peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, ambas podem formar radical hidroxil, que provoca danos às proteínas, lipídios e DNA.

Vários artigos foram consultados para a elaboração do modelo experimental por DEN (Hacker et al., 1991; Chen et al., 1993; Shiota et al., 1999; Frey et al., 2000; Finnberg et al., 2004; Park et al., 2008; Teoh et al., 2008; Zimmers et al., 2008). Alguns autores recomendam que a dose utilizada deva ser preferencialmente alta, pois dose baixa (<5µg/g por peso) permitem reparos, não desenvolvendo a neoplasia (Williams et al., 2000). O tempo de latência estimado é de 3 a 5 meses. Na escolha dos animais deve ser levada em consideração o gênero e a idade, segundo Nakatani et al., (2001), as fêmeas desenvolvem CHC por DEN em apenas 30%, acreditam que exista efeito inibitório promovido pelo estrogênio. Em contrapartida, 100% dos machos irão formar CHC, devido à estimulação androgênica sobre a hepatocarcinogênese. Ocorre mais CHC em animais jovens, em função das altas taxas proliferativas de hepatócitos na primeira fase da vida (Vesselinovitch e Mihailovich, 1983).

A literatura oferece inúmeros protocolos de pesquisa, o que reforça a ideia da falta de um modelo padrão. As doses de DEN variam de 5 a 200mg/Kg, administrado intraperitoneal em dose única ou repetidas vezes. O tempo de latência é outro ponto bastante conflitante, pois a literatura abrange de 20 a 104 semanas para estabelecimento do tumor. O uso de indutores enzimáticos, também é polêmico, pois alguns estudos utilizam indutores enzimáticos para potencializar a formação da doença, combinando o DEN ao fenobarbital (PB) (Hacker et al., 1991; Chen et al., 1993; Shiota et al., 1999; Frey et al., 2000; Finnberg et al., 2004; Park et al., 2008; Teoh et al., 2008; Zimmers et al., 2008), em contrapartida outros protocolos desaconselham seu uso.

Neste contexto de variadas propostas é necessário estabelecer o modelo experimental de CHC em que o tumor se desenvolva espontaneamente, no ambiente da fibrose, mimetizando a evolução do crescimento do carcinoma. A padronização deste

modelo permitirá sugerir as rotas metabólicas e fisiológicas da doença e promover estudos futuros pré-clínicos.

Com base nos conceitos e estudos citados, esta pesquisa buscou determinar um modelo experimental de carcinogênese hepática, para comparar lesões pré-cancerosas com carcinoma avançado quanto aos aspectos bioquímicos, histológicos e de estresse oxidativo e posteriormente avaliar o efeito da administração da Melatonina durante a hepatocarcinogênese experimental sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo e apoptose.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta tese foi estabelecer um modelo experimental de carcinoma hepatocelular, avaliando o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e apoptose frente ao uso ou não de melatonina.

2.2 Objetivos específicos para o Experimento I

2.2.1. Determinar o modelo experimental de Carcinoma Hepatocelular e comparar lesões pré-cancerosas (PL) com CHC avançado

1. Descrever as etapas do desenho experimental para estabelecimento da carcinogênese por indução química em ratos.
2. Caracterizar as manifestações do aspecto geral e somático: avaliar aspectos gerais, como peso, relação hepatossomática, análise macroscópica do fígado, avaliando nódulos e massas tumorais.
3. Avaliar aspectos histológicos: realizar análise histopatológica no tecido hepático, por meio da coloração hematoxilina e eosina e picrosirius em animais com lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.
4. Quantificar as enzimas de integridade hepática (AST, ALT, FA e γ GT) dos animais com lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.

2.3 Objetivos específicos para o Experimento II

2.3.1. Determinar a ação da Melatonina na carcinogênese hepática experimental sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e a apoptose.

1. Avaliar a relação hepatossomática dos animais submetidos à carcinogênese com e sem Melatonina.
2. Avaliar as enzimas de integridade hepática mediante a quantificação de AST, ALT, FA e γ GT dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

3. Avaliar os aspectos macroscópicos do fígado dos animais submetidos à carcinogênese com ou sem Melatonina;
4. Avaliar aspectos histológicos do fígado pela coloração HE dos fígados dos animais submetidos à carcinogênese e tratados com ou sem Melatonina;
5. Determinar a reação ductular: pela positividade da citoqueratina 7 (pCK7) no tecido hepático de animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;
6. Determinar o dano ao DNA (mutagenicidade) do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;
7. Determinar a expressão do marcador tumoral GST-P do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina
8. Determinar o estresse oxidativo do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina mediante a avaliação de TBARS, da atividade de enzima antioxidante (SOD) e da expressão do fator nuclear Nrf2, seu inibidor KEAP1 e da proteína NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1);
9. Determinar expressão de iNOS, eNOS, fator nuclear kB e COX-2 do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;
10. Comprovar o efeito da Melatonina sobre o estresse de retículo e a apoptose na carcinogênese hepática mediante a análise por Western blot da expressão de proteínas envolvidas com estresse de retículo (ATF6, BiP e CHOP/ GADD) e de proteínas proapoptóticas (Fas, Bax, TRAIL) e anti-apoptóticas (Bcl2, Bclx/L), p53, caspases 8, 9 e 3.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A estrutura desta tese está esquematizada no quadro abaixo (Figura 10), o qual apresenta os momentos de indução do CHC, o objetivo primário estabelecido e os artigos gerados a partir dos resultados obtidos.

Experimento	Objetivo	Artigo	Nº CEP FIPE/HCPA
Estudo Piloto*	Avaliar a ação do DEN em ratos Wistar.	<i>Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study. <i>Protoplasma</i>, (2015), may 252 (3) 825-33.</i>	09588
Experimento I	Caracterizar modelo de CHC Comparar lesões pré-cancerosas com CHC.	<i>Artigo 1: Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats. <i>Toxicology Reports 2</i> (2015) 333–340.</i>	120355
Experimento II	Avaliar o efeito a Melatonina na hepatocarcinogênese experimental sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo e apoptose.	<i>Artigo 2: Melatonin attenuates oxidative damage in hepatic carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats. <i>Submetido Toxicologic Pathology</i>, 2015.</i> <i>Artigo 3: Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. <i>PlosOne</i>, aceito (2015).</i>	140311

Figura 10: Quadro demonstrativo das fases experimentais desenvolvidas nesta tese.

* O *estudo piloto* não faz parte desta tese, porém suas evidências foram importantes para o conhecimento da ação do DEN em ratos e para estabelecer os protocolos experimentais testados nesta tese (Anexo C).

3.1. Experimento I: determinar o modelo experimental de Carcinoma Hepatocelular e comparar lesões pré-cancerosas (PL) com CHC avançado

3.1.1 Delineamento da pesquisa

Este estudo teve caráter experimental qualitativo e quantitativo, buscando a indução do carcinoma hepatocelular em ratos para estudar a carcinogênese hepática.

3.1.2 População em estudo

Os procedimentos com os animais seguiram o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Goldin e Raymundo, 1997). O estudo também obedeceu à Legislação Brasileira e o Código Estadual de Proteção aos Animais, (lei 11.794/08), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática. Atendemos as Normativas 12 e 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA: Normativa 12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA) e Normativa 13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia – AVMA, 2013).

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, em torno de 1 mês de idade, com peso de 130 a 140gr. Os animais receberam alimentação recomendada pelos profissionais da Unidade de Experimentação Animal (UEA), e foram mantidos no Centro de Experimentação Animal do HCPA durante o experimento, acondicionados em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha (5 animais em cada caixa), em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 22°C \pm 2. Receberam ração e água "*ad libitum*". O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA/ FIPE sob o número 120355.

3.1.3 Delineamento experimental

3.1.3.1 Agentes Carginogênicos

Dietilnitrosamina (DEN) da marca SIGMA Chemical Co St Louis, Mo, código N0258, com peso molecular 102,14 g/ mol ressuspenso em solução salina, em 3 concentrações 50 mg/ Kg; 75mg/Kg e 100 mg/Kg.

Acetilaminofluoreno 2 (2-AAF) da marca SIGMA Chemical Co St Louis, Mo, código A7015, com peso molecular de 223,27 g/ mol, na concentração de 100 mg/ Kg.

3.1.3.2 Animais e protocolos

Os 48 animais foram divididos em quatro grupos: controle (CO) (n=6): submetido à injeção com solução fisiológica e três grupos testes, que receberam DEN em doses e tempos distintos. Abaixo seguem as descrições de três metodologias propostas para estabelecer o protocolo do Modelo Experimental de indução química de CHC (grupos com 12 animais):

- **TESTE 1 (DEN50):** Os animais do grupo DEN50, sem qualquer tratamento prévio, foram submetidos 2x/semana, à administração intraperitoneal, de solução de dietilnitrosamina (DEN, Sigma Química), 50mg/kg diluído em solução fisiológica no período de 19 semanas (adaptação de Park et al., 2009 e Nagahara et al., 2010) conforme figura 11.

- **TESTE 2: (DEN75):** Os animais do grupo DEN75, sem qualquer tratamento prévio, foram submetidos 1x/semana, à administração intraperitoneal, de solução de dietilnitrosamina (DEN, Sigma Química), 75mg/kg diluído em solução fisiológica no período de 19 semanas (adaptação de Shiota et al., 1999) conforme figura 11.

- **TESTE 3 (DEN100):** Os animais do grupo DEN100, sem qualquer tratamento prévio, foram submetidos 1x/ a cada 6 semanas, à administração intraperitonealmente, de solução de dietilnitrosamina (DEN, Sigma Química), 100 mg/kg diluído em solução fisiológica no período de 28 semanas (adaptação de Yoshiro et al., 2005) conforme figura 11.

Todos os animais teste receberam dose única de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) à 100mg/ kg na 4ª semana.

Grupo	Descrição do Protocolo
Grupo DEN50	2x por semana DEN (50 mg/Kg i.p.) até a 3ª semana 1x por semana de DEN (50mg/Kg) + 100mg/kg de 2-AAF na 4ª semana 2x por semana de DEN (50 mg/Kg i.p.) na 5ª semana 1x por semana de DEN 50mg/Kg na 6ª semana Suspender por 4 semanas Reiniciar a indução 1x por semana 50mg/Kg na 11ª até 13ª Eutanásia na 19ª semana
Grupo DEN75	1x por semana DEN (75 mg/Kg i.p.) até a 3ª semana 1x por semana de DEN (75mg/Kg) + 100mg/kg de 2-AAF na 4ª semana 1x por semana de DEN (75 mg/Kg i.p.) na 5ª e 6ª semana Suspender por 4 semanas Reiniciar a indução 1x por semana 75mg/Kg na 11ª até 13ª Eutanásia na 19ª semana
Grupo DEN100	1 dose a cada 6 semanas DEN (100 mg/Kg i.p.) por 28 semanas 100mg/kg 2-AAF na 4ª semana Eutanásia na 28ª semana

Figura 11: Descrição completa dos protocolos experimentais para indução do carcinoma hepatocelular.

O trabalho investigativo consistiu em analisar cada grupo teste, quanto aos aspectos bioquímicos e morfológicos do fígado, após o período pré-estabelecido de indução com DEN, para definir o melhor protocolo para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

As mortes dos animais ocorreram na 19ª semana (grupos DEN50 e DEN75) e 28ª semana (grupo DEN100) após o início da indução. Para a eutanásia foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% (50mg/Kg de peso corporal) e Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg de peso corporal) intraperitonealmente. Inicialmente foi realizada uma tricotomia manual da região abdominal, neste momento foi coletado sangue para análises bioquímicas. Em seguida, realizou-se a laparotomia mediana ventral e a exposição do fígado. Por fim, os animais foram mortos por ensanguinação sob anestesia profunda.

O fígado e o baço foram removidos e ambos, pesados e avaliados quanto aos aspectos gerais como cor, textura e consistência. Amostras de fígado foram retiradas para análises histológicas.

3.1.3.3 Análises bioquímicas.

O sangue foi coletado através da técnica da punção do plexo venoso retro-orbital com tubo de capilar de vidro heparinizado e foi acondicionado em frascos devidamente preparados para serem realizadas as análises de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil-transferase (γ GT). Os níveis séricos de ALT (U/L) e AST (U/L) foram determinados por teste cinético ultra violeta. As enzimas γ GT (U/L) e a FA (U/L) foram quantificadas pelo teste colorimétrico cinético. As dosagens séricas foram realizadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por método enzimático automatizado (sistema Siemens Advia 1800).

3.1.3.4. Estudo histopatológico dos fígados.

Após a dissecação, o fígado foi colocado em formalina tamponada a 10% e encaminhados ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Onde posteriormente foram incluídos em blocos de parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz 1512) e cortados. Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes de hematoxilina e eosina e picrosírius intermediadas por banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Se colocou a lamínula sobre a lâmina, utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação.

As lâminas foram analisadas em microscópio binocular Nikon Labophot nos diferentes aumentos equipado com câmera digital para captura de imagens através do software Image-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA). Todos os cortes foram analisados em microscópio por observador cego.

A percentagem de fibrose (%) no tecido do fígado foi determinado por medições morfométricas das lâminas coradas com picrosírius. Dez imagens de cada lâmina foram capturadas a partir de campos selecionados aleatoriamente (200 \times ampliação) contendo o área de tecido conjuntivo positivo. A avaliação morfométrica da percentagem do tecido conjuntivo em relação ao conjunto de fígado foi realizada utilizando o Adobe PhotoshopCS5 prolongado 10,0 (Adobe Systems, San Jose, CA), conforme o protocolo descrito por Souza et al., (2014).

3.1.3.5. *Determinação do Estresse Oxidativo*

- i. **Preparação do homogeneizado:** foram colocados 9 ml de tampão fosfato por grama de tecido e, em seguida, homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK) por dois minutos à temperatura de 0-2°C. Este homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge) por 10 minutos a 4000 rpm (Llesuy et al., 1985). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante utilizado para medidas de lipoperoxidação (LPO) e atividade enzimática endógena.
- ii. **Dosagem de Proteína:** as concentrações de proteína no homogeneizado dos fígados foram determinadas utilizando método Bradford (1976).
- iii. **Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):** foi determinada a lipoperoxidação através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de TBARS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol/mg de proteína (Buege e Aust, 1978).
- iv. **Avaliação da Atividade da Enzima Antioxidante Superóxido de Dismutase:** a avaliação da atividade da SOD foi realizada pelo método descrito por Misra e Fridovich (1972) que se baseia na inibição da formação de adrenocromo na auto-oxidação da adrenalina pela superóxido dismutase (SOD).

3.1.3.6. *Preparação dos Extratos Citoplasmático e Nuclear para Western blotting.*

Os extratos citoplasmáticos utilizados para detecção da expressão das proteínas citoplasmáticas foram preparados a partir de um homogeneizado do fígado em um tampão de lise (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0) acrescido de inibidores de proteases. Para a preparação do extrato nuclear para análise de Western blot: o fígado foi lavado rapidamente com TBS gelado e homogeneizado em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 5mM Na₃VO₄, 1mM Naf, 1mM NaPPi e 1mM de PMSF) em tubo Dalce com pistilo de teflon, em ciclos de 30 segundos, seguido de repouso em gelo por 30 minutos. O homogeneizado

foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. As amostras foram armazenadas a -80°C para posteriores análises.

3.1.3.7. Determinação das expressões de proteínas: *TGF-1 β* , *eNOS*, *iNOS*, *Keap1*, *Nrf2*, *NQO1*, *HSP70*.

A técnica utilizada para esta quantificação foi a de Western blot, utilizando o sistema descrito por Laemmli (1970) para a eletroforese, e para o blotting a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979).

Foi determinada a expressão das seguintes proteínas TGF-1 β , eNOS, iNOS, Keap1, Nrf2, NQO1, HSP70. As proteínas (80 μg) foram separadas por gel de poliácridamida 10-15% e transferidas eletricamente para membranas de difluorido de polivinilideno (Millipore, Bradford, MA, USA). Posteriormente as membranas foram colocadas na solução de bloqueio Tris/salina-tamponada/Tween-20 (TBST - 5% de leite em pó desnatado em tampão fosfato salina-Tris contendo 0,05% Tween 20) durante 60 minutos, a 37°C .

A membrana ficou incubada durante toda a noite a 4°C com anticorpo policlonais: anti-TGF-1 (SC31609/ 25kDa), anti-eNOS (SC8311/ 140kDa), anti-iNOS (SC7271/ 130kDa), anti-NQO1 (SC376023/ 32 kDa), anti-Keap1 (SC 33569/ 69kDa) e anti-Nrf2 (SC30915/ 57kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) em diluição de 1:200–1:1000 com TTBS in 5% de leite desnatado. O anticorpo anti-HSP70 (H5147/ 73 e 72kDa) (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO, USA) na diluição de 1:5000 com TTBS in 5% de leite desnatado, e o anticorpo anti-GAPDH (G9545/37kDa) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) na diluição de 1:1000.

Após as membranas foram lavadas com TBST e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com um anticorpo anti-imunoglobulina de coelho ou camundongo, unido a HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca). As proteínas foram detectadas mediante quimiluminescência, utilizando o kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e a densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem (Image J, USA) (Tuñón et al., 2013).

3.2 Experimento II: estudar o efeito da Melatonina durante a hepatocarcinogênese experimental sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e apoptose.

3.2.1 Delineamento da pesquisa

Este estudo teve caráter experimental qualitativo e quantitativo, buscando a indução do carcinoma hepatocelular em ratos para estudar a ação da melatonina sobre carcinogêneses hepática.

3.2.2 População em estudo

Os procedimentos com os animais seguiram o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Goldin e Raymundo, 1997). O estudo também obedeceu à Legislação Brasileira e o Código Estadual de Proteção aos Animais, (lei 11.794/08), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática.

Atendemos as Normativas 12 e 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA: Normativa 12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA) e Normativa 13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) (AVMA, 2013).

Para esta etapa foi novamente realizado a indução do CHC e tratados com melatonina. Os 48 ratos Wistar, pesando cerca de 140g, foram divididos em cinco grupos: (I) controle (CO); (II) controle + Melatonina (CO+MEL); (III) Carcinoma Hepatocelular (CHC); (IV) Carcinoma Hepatocelular + Melatonina iniciado o tratamento na 5ª semana (CHC+MEL5) e (V) Carcinoma Hepatocelular + Melatonina iniciado o tratamento na 12ª semana (CHC+MEL12).

O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA/ FIPE sob o número 140311. Os animais receberam alimentação recomendada pelos profissionais da Unidade de Experimentação Animal (UEA), e foram acondicionados em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha (5 animais em cada caixa), em

ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 22°C \pm 2. Receberam ração e água "ad libitum".

3.2.3 Delineamento experimental

3.2.3.1 Animais e protocolo.

Os animais foram divididos em grupo controle (CO): submetido à injeção com solução fisiológica e grupo CHC: submetido à injeção com Dietilnitrosoamina, conforme descrição na figura 12:

2x por semana DEN (50 mg/Kg i.p.) até a 3 ^a semana 1x por semana de DEN (50mg/Kg) + 100mg 2-AAF na 4 ^a semana 2x por semana de DEN (50 mg/Kg i.p.) na 5 ^a semana 1x por semana de DEN 50mg/Kg na 6 ^a semana Suspender por 4 semanas Reiniciar a indução 1x por semana 50mg/Kg na 11 ^a até 13 ^a Eutanásia na 19 ^a semana <i>Moreira et al, 2015</i>
--

Figura 12: descrição do protocolo DEN50 de exposição crônica e intermitente de dietilnitrosamina + acetilaminofluoreno para desenvolvimento do carcinoma hepatocelular avançado em 19 semanas.

O tratamento com Melatonina foi baseado no protocolo de Molpeceres et al., 2007, que propõe o uso da Melatonina (Sigma Chemical) na concentração final de 20mg/L na água de beber. Para controlar o volume bebido, os animais foram colocados em caixas separadas e seus volumes de água medidos diariamente.

O tratamento com Melatonina teve início na 5^a e na 12^a semana, momentos em que 10 animais, por grupo passaram a receber Melatonina 20mg/L na água de beber. Estes tempos foram escolhidos com base nas análises da 1^a Etapa desta pesquisa sobre a evolução da carcinogênese experimental, que caracterizou a fase inflamatória na 5^a semana de exposição ao DEN e a fase cirrótica na 12^a semana.

Com este desenho experimental, poderemos acompanhar a ação da melatonina sobre tecido hepático inflamado durante o processo de carcinogênese e a ação da Melatonina sobre tecido hepático cirrótico em processo de carcinogênese (Figura 13).

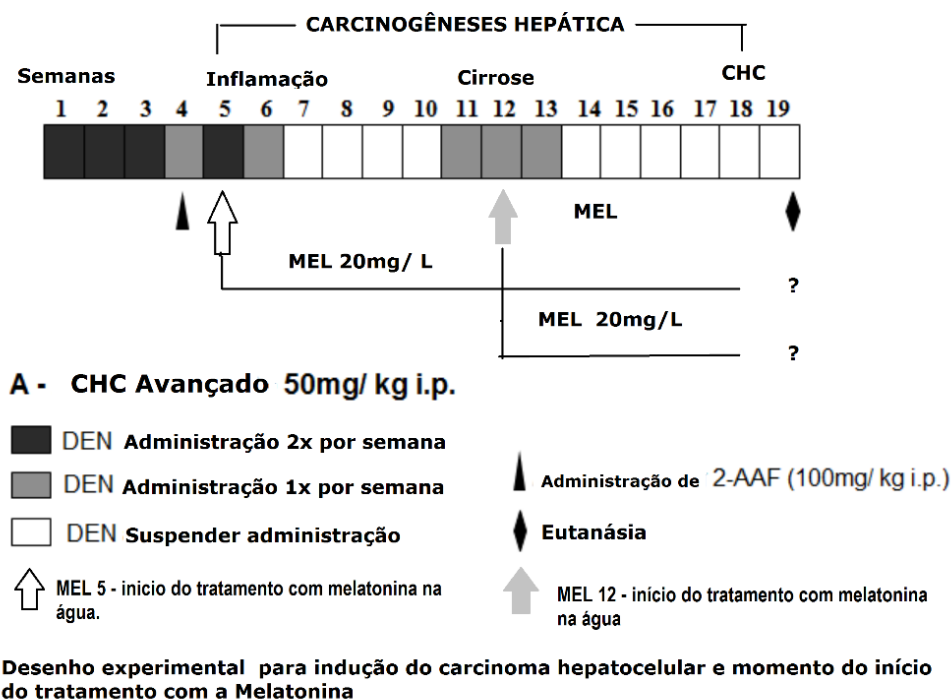


Figura 13: desenho experimental de indução ao carcinoma hepatocelular e tempos de tratamentos com melatonina 20mg/ L (Fonte: do autor).

Após o período de 19 semanas os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% (50mg/Kg de peso corporal) e Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg de peso corporal) intraperitonealmente. Neste momento foi coletado o sangue para as análises posteriores. O fígado e baço foram removidos e pesados. As amostras do fígado foram retiradas sempre do mesmo lóbulo e congelados à -80°C. Por fim, os animais foram mortos por ensanguinação sob anestesia profunda.

3.2.3.2 Avaliação da sobrevivência dos animais submetidos à carcinogênese e tratados com melatonina:

Foi realizada a curva de Kaplan-Meier no período de 19 semanas comparando a sobrevivência dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com melatonina.

3.2.3.3. Análises bioquímica:

O sangue foi coletado através da técnica da punção do plexo venoso retro-orbital com tubo de capilar de vidro heparinizado e foi acondicionado em frascos devidamente preparados para serem realizadas as análises de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil-transferase (γ GT). Os níveis séricos de ALT (U/L) e AST (U/L) foram determinados por teste cinético ultra violeta. As enzimas γ GT (U/L) e a FA (U/L) foram quantificadas pelo teste colorimétrico cinético. As dosagens séricas foram realizadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por método enzimático automatizado (sistema Siemens Advia 1800).

3.2.3.4 Estudo Histopatológico

Amostras de tecido hepático foram coradas com hematoxilina e eosina, para avaliar o parênquima hepático dos animais submetidos ao DEN e tratados com ou sem melatonina. Após a dissecação, o fígado foi colocado em formalina tamponada a 10% e encaminhados ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Onde posteriormente foram incluídos em blocos de parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz 1512) e cortados. Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes de hematoxilina e eosina intermediadas por banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Se colocou a lamínula sobre a lâmina, utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular Nikon Labophot nos diferentes aumentos equipado com câmera digital para captura de imagens através do software Image-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA). Todos os cortes foram analisados em microscópio por observador cegado.

3.2.3.5 Análise imuno-histoquímica de citoqueratina 7 (CK7), preparação das amostras e captura das imagens

Para determinar a reação ductular dos fígados dos animais submetidos à indução de CHC por DEN e tratados com melatonina, foi realizado a técnica de imuno-histoquímica em lâminas de fígado incubadas com anti-citoqueratina 7 (CK7) (diluição 1:50, Ab9021

Abcam) durante 1 h à temperatura ambiente. A forma de captura seguiu a descrita no percentual de fibrose do item 3.1.3.4 (Souza et al., 2014).

3.2.3.6 *Determinação da Genotoxicidade.*

O ensaio cometa foi realizado como descrito por Tice et al., (2000). e adaptado por Hartmann et al., (2003). Foram selecionadas imagens de 100 células aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas em duplicata). As células foram também avaliadas visualmente de acordo com o tamanho da cauda em cinco classes de índice de dano (DI), que vão desde não danificado (0, 100 células x 0) a um máximo de 400, 100 células danificadas x 4). Isto produziu um único ponto de dano de DNA para cada animal e, conseqüentemente, para cada grupo. Frequência de dano (DF) foi calculada com base no número de células com cauda versus aqueles sem cauda. Neste momento, foram avaliados os tecidos hepáticos exposto ao DEN sem e com tratamento com melatonina gerando o índice de dano (DI) e a frequência de dano (DF) presente nos hepatócitos.

3.2.3.7 *Determinação do Estresse Oxidativo e enzima antioxidante*

- i. **Preparação do homogeneizado:** foram colocados 9 ml de tampão fosfato por grama de tecido e, em seguida, homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK) por dois minutos à temperatura de 0-2°C. Este homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge) por 10 minutos a 4000 rpm (Llesuy et al., 1985). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante utilizado para medidas de lipoperoxidação (LPO) e atividade enzimática endógena.
- ii. **Dosagem de Proteína:** as concentrações de proteína no homogeneizado dos fígados foram determinadas utilizando método Bradford (1976).
- iii. **Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):** foi determinada a lipoperoxidação no homogeneizado de fígado de animais submetidos a carcinogênese e tratados com melatonina, pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Buege e Aust, 1978 (*ver item 3.1.3.5.iii*).
- iv. **Avaliação da Atividade da Enzima Antioxidante Superóxido de Dismutase:** a avaliação da atividade da SOD foi realizada pelo método descrito por Misra e Fridovich (1972) (*ver item 3.1.3.5.iv*).

- v. **Determinação das proteínas carboniladas:** a formação de proteínas carboniladas é uma forma de avaliar danos oxidativo sobre esta molécula. Foi determinada de acordo com *kit* comercial de ensaio de proteínas carboniladas MAK 094 Sigma-Aldrich, EUA. A absorvância espectrofotométrica utilizada foi a 375nm. Os resultados foram calculados como nmol de carbonilas/ mg de proteína.

3.2.3.8 Preparação dos Extratos Citoplasmático e Nuclear para Western blotting.

Os extratos citoplasmáticos utilizados para detecção da expressão das proteínas citoplasmáticas foram preparados a partir de um homogeneizado do fígado em um tampão de lise (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0) acrescido de inibidores de proteases.

Para a preparação do extrato nuclear para análise de Western blot: o fígado foi lavado rapidamente com TBS gelado e homogeneizado em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 5mM Na₃VO₄, 1mM Naf, 1mM NaPPi e 1mM de PMSF) em tubo Dalce com pistilo de teflon, em ciclos de 30 segundos, seguido de repouso em gelo por 30 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. As amostras foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

3.2.3.9 Determinação das expressões de proteínas envolvidas no estresse oxidativo, dano celular, estresse de retículo e apoptose

A técnica utilizada para esta quantificação foi a de Western blot, utilizando o sistema descrito por Laemmli (1970) para a eletroforese, e para o blotting a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979).

Foram avaliadas proteínas, envolvidas na inflamação, no estresse oxidativo, no estresse de retículo e na apoptose, em homogeneizado de fígado de animais submetidos à carcinogêneses e tratados com melatonina. O quadro a seguir apresenta as proteínas avaliadas e suas características técnicas (Figura 14).

	Proteína	Código	P.M. (kDa)	Marca	Diluição	Anticorpo 2º
INFLAMAÇÃO	TGF1β	SC31609	25	Santa Cruz Biotech	1:500	SC2020
	eNOS	SC8311	140	Santa Cruz Biotec	1:750	SC2004
	iNOS	SC7271	130	Santa Cruz Biotech	1:750	SC2005
	p65	SC 8008	65	Santa Cruz Biotec	1:1000	SC2005
	COX-2	SC 7951	72	Santa Cruz Biotech	1:200	SC2004
EO	Keap1	SC 33569	69	Santa Cruz Biotec	1:1000	SC2004
	Nrf2	SC30915	57	Santa Cruz Biotech	1:200	SC2020
	NQO1	SC376023	32	Santa Cruz Biotech	1:100	SC2005
MT	GST-P	P04906	27	Enzo Life Science	1:200	Rabbit
NOR	GAPDH	G9545	37	Sigma-Aldrich	1:1000	A0545
	Actina	A5060	42	Sigma-Aldrich	1:500	A1949
ERE	ATF6	SC166659	90/ 50	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC2005
	BiP/ GRP78	SC376768	78	Santa Cruz Biotec	1:1000	SC2064
	CHOP/ GADD	SC175	30	Santa Cruz Biotech	1:500	SC2004
APOPTOSE	PARP	SC 74470	114	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC2005
	p53	SC 1313	53	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC2020
	Bcl-2	SC 783	25-28	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC2004
	BAX	SC 6236	25	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC2004
	Cytochrome C	SC 13560	14	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC200
	Caspase 9	P55211	46-50	Alexis Bioch	1:1000	Mouse
	Caspase 3	#9662	17/ 35	Cells Signaling	1:50	Rabbit
	Caspase 8	AAM 118E	50-57	Alexis Bioch	1:000	Mouse
	FAS-L	SC6237	34-39	Santa Cruz Biotech	1:1000	SC2004

Figura 14: quadro descritivo dos anticorpos utilizados e suas características técnicas. ERE: estresse de retículo endoplasmático; EO: estresse oxidativo; MT: marcador tumoral; NOR: proteínas normalizadoras; PM: peso molecular.

As proteínas (80 μ g) foram separadas por gel de poliacrilamida 10-15% e transferidas eletricamente para membranas de difluorido de polivinilideno (Millipore, Bradford, MA, USA). Posteriormente as membranas foram colocadas na solução de bloqueio Tris/salina-tamponada/Tween-20 (TTBS - 5% de leite em pó desnatado em tampão fosfato salina-Tris contendo 0,05% Tween 20) durante 60 minutos, a 37° C. A membrana ficou incubada durante toda a noite a 4°C com anticorpo específico em diluição

de 1:200–1:1000 com TTBS in 5% de leite desnatado (ver quadro de anticorpos testados figura 14).

Depois, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com um anticorpo anti-imunoglobulina de coelho ou camundongo, unido a HRP. As proteínas foram detectadas mediante quimiluminescência, utilizando o kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e a densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem (Image J, USA) (Tuñón et al., 2013).

3.3 Análise estatística

Tamanho da Amostra: 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 sete (7) ratos por grupos, totalizando 28 ratos ao todo para o experimento I. Iniciou-se com 50% a mais de animais, em função das perdas que ocorrem nas primeiras semanas de indução. No experimento II foram utilizados 48 animais, subdivididos em 5 grupos (Hulley et al., 2006).

Análise Estatística: os dados quantitativos gerados foram descritos por média e desvio padrão. A comparação dos grupos foi realizada pelo procedimento de análise de variáveis ou de acordo com o modelo experimental por ANOVA ONEWAY. Na localização de diferença foi executado o teste de Tukey ou teste Bonferoni. Para as variáveis qualitativas foi usado o teste de Qui-quadrado. A análise de correlação foi avaliada pelo coeficiente de Pearson. Todos os dados foram analisados com o programa SPSS 21, e o nível de significância exigido foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resultados Gerais do Experimento I (CEP/ HCPA/ FIPE – 120355).

Descrever as etapas do desenho experimental para estabelecimento da carcinogênese por indução química em ratos.

Foram testados três protocolos para estabelecer o CHC experimental, a metodologia utilizada seguiu a proposta da exposição crônica e intermitente aos agentes carcinogênicos, variando a quantidade de droga e o tempo. Ao longo do processo de indução, houveram mortes (30% da amostra) por doença hepática induzida por droga e falência hepática pela toxicidade da dietilnitrosamina. Isso ocorreu, principalmente, na 5^a e 6^a semana nos grupos DEN50 e DEN75. O tempo mínimo para o grupo DEN50 desenvolver CHC foi de 16 semanas, como demonstrada na tabela 1.

Tabela 1: Causas de morte em função do tempo de indução com DEN+2-AAF.

Tabela Cruzada	Causa da morte			Total
	DILI	Tumor	Sem tumor	
5 ^a	2	0	0	2
6 ^a	8	0	0	8
17 ^a	0	2	0	2
19 ^a	0	12	3	15
28 ^a	0	9	0	9
Total	10	23	3	36
Pearson Chi-Square		50,612 ^a	10	p=0,0001
Linear by Linear association		19,08	1	p=0,0001
Pearson R ²		0,798		p=0,0001

a = assume a diferença entre os grupos ou a associação entre eles de causa-efeito DILI: doença hepática induzida por droga (n=36 ratos que receberam DEN). Teste qui-quadrado (coeficiente de Pearson), significância estatística com p<0,05.

Na 19^a e na 28^a semana os animais foram avaliados quando aos aspectos gerais, sendo observados sinais de caquexia em todos os animais dos grupos DEN50 e DEN75, o volume do estômago reduzido, alças intestinais adelgadas e com pouca gordura.

A média dos pesos dos animais ao final do estudo também apresentou diferença entre o DEN50 e DEN75 comparado aos animais CO. O DEN50 teve cerca de 30% a menos de peso final que o controle ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 Média do peso inicial e final por grupo.

Média (g)	CO	DEN50	DEN75	DEN100
Peso Inicial	145,8 \pm 3,9	147,1 \pm 7,0	156,5 \pm 6,6	154 \pm 6,2
Peso Final	466,1 \pm 9	323,5 \pm 53 ^a	376,0 \pm 44 ^a	436,9 \pm 26

^a O peso final DEN50 e DEN75 vs CO com $p < 0,05$. Teste Tukey.

A média da relação hepatossomática do DEN50 foi de 12,44%, enquanto que o grupo controle teve percentual de 3,48 (Figura 15).

Relação hepatossomática por grupo de DEN

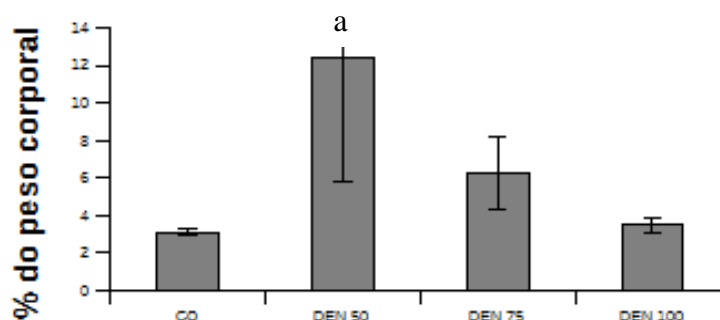


Figura 15: Relação hepatossomática. O grupo DEN50 apresentou diferença estatística comparado ao seu controle, ^a $p < 0,05$. Teste de Tukey.

A avaliação macroscópica foi feita pela visualização da peça tumoral e microscopicamente pelas colorações hematoxilina e eosina e picrossirius. Os fígados dos animais DEN50 e DEN75 estavam pálidos, de cor esverdeada ou parda. Nesta análise foram evidenciados fígados com massa unifocal, formando nódulo único geralmente grande (grupo DEN50); nódulos multifocais de tamanhos variáveis, amplamente distribuídos (grupo DEN75); câncer difusamente infiltrativo, sem áreas definida, permeando extensamente e envolvendo todo o fígado (grupo DEN75) (Figura 16).



Figura 16: aspectos macroscópicos dos tumores. A: fígado com aparência normal no grupo CO. B: Neoplasia unifocal maciça que substitui a maior parte do lobo hepático direito, predomínio no grupo DEN50. C: nódulos multifocais de tamanhos variáveis, amplamente distribuídos com fígado cirrótico, visto no grupo DEN75 e D: lesões pré-cancerosas, predomínio no grupo DEN100.

As análises das enzimas de integridade hepática apresentaram aumento nos três grupos DEN (Tabela. 3). As alterações mais evidentes foram o grupo DEN50.

Tabela 3 Valores das enzimas de integridade hepática após indução com DEN.

Grupo	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	γ GT (U/L)
CO	141,5 \pm 6,6	49,5 \pm 4,2	71,5 \pm 12	2,25 \pm 0,9
DEN50	237,8 \pm 77 ^a	160,2 \pm 27 ^a	249,6 \pm 84 ^a	113,8 \pm 6,6 ^a
DEN75	148,6 \pm 31	79,83 \pm 27	201,6 \pm 52 ^b	31,17 \pm 35
DEN100	101,7 \pm 23	62,33 \pm 9	141,1 \pm 57	10,22 \pm 4

Resultados são expressos em média e \pm DP para 6-8 animais. ^a $p < 0,05$ com diferença significativa do grupo DEN50 vs CO e DEN100. ^b $p < 0,05$ com diferença significativa do grupo DEN75 vs CO. Teste Tukey.

A avaliação histológica realizada no grupo DEN50 foi conclusiva para CHC. O grupo DEN100 teve aspecto histológico para displasia de baixo grau com lesões pré-cancerosas. O grupo DEN75 foi o mais heterogêneo, pois apresentou tanto sinais de malignidade, quanto focos de displasias (Figura 17).

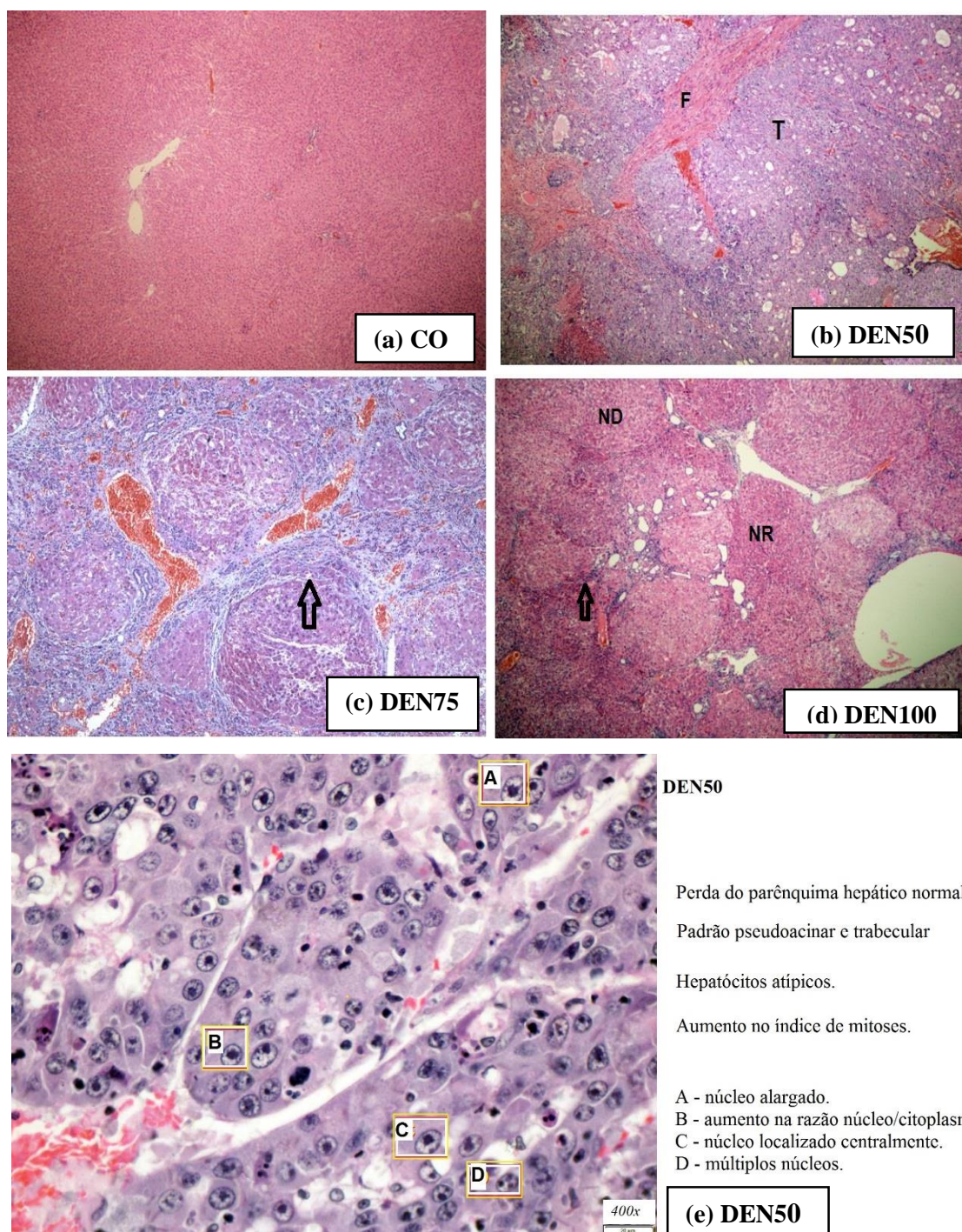


Figura 17: Fotomicrografias de fígados. **a)** CO: parênquima hepático normal; **b)** DEN50: fígado com perda do parênquima hepático, com extensa área tumoral (T) com septo fibroso (F); **c)** DEN75: aspecto cirrótico com nódulos regenerativos e displásicos; **d)** DEN100: displasia de baixo grau, padrão cirrótico com septos fibrosos (seta), nódulos regenerativos (NR) e nódulos displásicos (ND). **e)** DEN50: descrição das alterações celulares encontradas. As imagens **a, b, c, d** com original magnitude 4x e a imagem **e** com original magnitude 40x, todas com coloração hematoxilina e eosina.

Todos os animais que receberam DEN desenvolveram tumores e apresentaram alterações nas enzimas hepáticas, porém os tempos em que apareceram sinais de malignidade foram distintos, assim como a gravidade do tumor. A frequência da fase dos CHC em função dos protocolos estudados está apresentada na tabela 4.

Tabela 4: percentual de animais com CHC em relação ao protocolo de indução.

Grupos	Lesões pré-cancerosas (%)	CHC inicial (%)	CHC avançado (%)
CO	0	0	0
DEN50	0	10%	90%
DEN75	30%	50%	20%
DEN100	60%	40%	0

Ocorrência das alterações de malignidade presentes ao longo do tempo de estudo por grupo.

Após a análise bioquímica e histopatológica dos fígados foi comprovado que grupo DEN50 desenvolveu carcinoma hepatocelular (CHC) avançado, enquanto que o grupo DEN100 apresentou aspecto histológico de lesões pré-cancerosas (PL). O grupo DEN75 não apresentou padrão homogêneo na indução do CHC. A partir deste momento foram realizadas comparações entre CHC avançado (DEN50) e PL (DEN100), comparando os aspectos histológico, bioquímico e o estresse oxidativo presente no tecido hepático.

As análises sobre o estresse oxidativo e as comparações entre CHC avançado e lesões pré-cancerosas foram publicados no artigo abaixo:

Artigo 1: Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats, Toxicology Reports 2 (2015) 333–340. Neste artigo são respondidos os seguintes objetivos:

Descrever as etapas do desenho experimental para estabelecimento da carcinogênese por indução química em ratos.

Caracterizar as manifestações do aspecto geral e somático: avaliar aspectos gerais, como peso, relação hepatossomática, avaliando nódulos e massas tumorais.

Avaliar aspectos histológicos: realizar análise histopatológica no tecido hepático, por meio da coloração hematoxilina e eosina e picrosirius em animais com lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.

Quantificar as enzimas de integridade hepática (AST, ALT, FA e γ GT) dos animais com lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.

Determinar o envolvimento do óxido nítrico (NO) em lesões pré-cancerosas e CHC avançado por meio da avaliação da expressão da eNOS e iNOS por Western blot.

Determinar o estresse oxidativo em lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado quantificando a lipoperoxidação, pelo método de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade da enzima superóxido de dismutase (SOD) e avaliando a expressão de proteínas envolvidas no estresse oxidativo (fator nuclear Nrf2, seu inibidor KEAP1 e da proteína NADPH quinona oxidoreductase 1 - NQO1) por Western blot.

Determinar o dano celular em lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado avaliando a expressão da HSP70 (72 e 73 kDa) por Western blot.

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/toxrep)

Toxicology Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxrep

Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats



Andrea J. Moreira^{a,b}, Graziella Rodrigues^{a,c}, Silvia Bona^{a,c},
 Carlos Thadeu Cerski^{a,d}, Claudio A. Marroni^{a,e}, Jose L. Mauriz^f,
 Javier González-Gallego^f, Norma P. Marroni^{a,b,c,g,*}

^a Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Graduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Graduate Program in Liver Diseases, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) and Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León, Spain

^g Graduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2014

Received in revised form

21 November 2014

Accepted 21 November 2014

Available online 28 November 2014

Keywords:

Hepatocarcinoma

Diethylnitrosamine

Oxidative stress

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

Nitric oxide synthase

Heat shock protein

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most frequent cause of cancer deaths throughout the world. This study was aimed to analyze oxidative stress and cell damage in a multistage model of liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN) in rats. Male Wistar rats weighing 145–150 g were divided into three groups: control, precancerous lesions (PL) (which received 100 mg DEN once a week every 6 weeks up to 28 weeks), and advanced HCC (50 mg DEN once/twice per week up to 19 weeks). Lipid peroxidation (TBARS), superoxide dismutase (SOD) activity, and expression of transforming growth factor-1 beta (TGF)-1 β , endothelial and inducible nitric oxide synthase (eNOS, iNOS), NADPH quinone oxidoreductase (NQO)-1, nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2), kelch-like ECH-associated protein (Keap)1 and heat shock protein (HSP)70 were measured. TBARS concentration was augmented in the PL and advanced HCC groups. SOD activity, TGF-1 β and Nrf2 expression were higher in animals with precancerous lesions. In advanced HCC, expression of NQO1 and iNOS increased while there was a decrease in HSP70 expression. Data obtained provide evidence for the differential activation of proteins involved in oxidative stress and cell damage during progression of carcinogenesis in an animal model of HCC.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ireland Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Abbreviations: 2-AAF, 2-acetylaminofluorene; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; DEN, diethylnitrosamine; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HCC, hepatocellular carcinoma; HSC, hepatic stellate cells; HSP70, heat shock 70-kDa protein; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Keap1, kelch-like ECH-associated protein 1; MDA, malonaldehyde; NQO1, NADPH quinone oxidoreductase-1; NO, nitric oxide; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PVDF, polyvinylidene fluoride; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactant substances; TGF-1 β , transforming growth factor-1 beta; TTBS, Tris-buffered containing 0.05% Tween 20; UV, ultra violet.

* Corresponding author at: Rua José Kanan Aranha, 102, 91760470 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 99643011; fax: +55 51 32483202.

E-mail address: nmarroni@terra.com.br (N.P. Marroni).

1. Introduction

The most common histological type of primary liver cancer is hepatocellular carcinoma (HCC). In 2008, there were approximately 694,000 deaths from HCC, making it the third most common cause of cancer death worldwide [1]. Chronic liver diseases are risk factors that predispose to HCC, as any agent or factor that chronically and slowly damages the hepatocytes induces mitosis and makes the DNA of these cells more susceptible to genetic alterations [2]. Such diseases include alcoholic cirrhosis, hepatitis B or C virus infection, α 1-antitrypsin deficiency, hemochromatosis and tyrosinemia. In HCV-positive patients, for example, HCC appears on average 30 years after infection, almost exclusively in those with cirrhosis [3]. The development of HCC is a complex process, involving accumulation of genetic and epigenetic alterations, which passes through stages of initiation, promotion and progression, and numerous experimental observations have shown that viral products may contribute to the malignant transformation of hepatocytes [4].

Curative therapeutic approaches for HCC involve liver transplantation, or surgical and radiofrequency ablation, but these treatments are not yet effective [5]. Although surgical resection can sometimes be curative, few patients have resectable tumors because of the presence of cirrhosis or distant metastases; moreover, even after resection, pre-existing liver cirrhosis persists and may cause other tumors in the remaining tissue. Orthotopic liver transplantation is the only truly curative therapy, although issues of recurrence and development of metastases remain. In case of unresectable tumor, treatment is limited, as HCC does not respond to chemotherapy and the liver does not tolerate high doses of radiotherapy [6].

HCC carries a high mortality rate and patients with chronic liver diseases usually take a long time before HCC occurs. Therefore, early diagnosis of HCC in precancerous lesions may improve the outcome of treatment, and it is necessary to encourage basic research to better understand the pathogenesis of this disease. Many experimental animal models of hepatocarcinogenesis have been described over the last decades. The most widely accepted, proposed by Farber et al. [7], combines chemical induction by diethylnitrosamine (DEN) with partial hepatectomy. Since then, DEN has been used to initiate the liver cancer either alone or in combination with other carcinogens [8–11]. However, fewer studies have characterized in detail the temporal evolution of oxidative stress and cell damage implicated in hepatocarcinogenesis. Understanding changes from pre-neoplastic to carcinoma lesions in oxidative stress, inflammation and liver fibrosis could be important to improve the knowledge on the transition of chronic inflammatory liver diseases to HCC. In the current study, we used a multistage model of chronic and intermittent exposure to DEN without partial hepatectomy to get insight into changes in markers of cell damage during progression of the disease. Two different protocols of drug exposure (designed to induce advanced HCC and precancerous lesions) allowed us to study effects of time on tumor onset, liver pathology, blood chemistry, and markers of oxidative stress and cell damage in the liver.

2. Materials and methods

2.1. Animals and procedures

Male Wistar rats weighing 145–150 g were used for this study and were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul (Brazil). The rats were caged at 24°C, under a 12-h light–dark cycle and with free access to food and water until the time of the experiments at the Animal Experimentation Division of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil). All experiments were performed in accordance with the *Guiding Principles for Research Involving Animals* (NAS) under protocol number 120355.

The animals were divided into three groups: CO: control, precancerous lesions (PL) and advanced HCC. Animals in the PL group were given diethylnitrosamine (DEN, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) at a dose of 100 mg/kg body weight i.p. once a week every 6 weeks up to 28 weeks. Animals in the advanced HCC group received DEN at a dose of 50 mg/kg body weight i.p. twice a week for the first three weeks and once a week from weeks 4 to 6 and 11 to 13 up to 19 weeks. A single dose of 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 100 mg/kg, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was administered in week 4 to both DEN groups.

Following a 12-h fast, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketalar®, 100 mg/kg – PubChem CID: 15851) and xylazine (50 mg/kg – PubChem CID: 5707) and subjected to blood collection for measurement of biochemical parameters.

Samples of livers for histology, biochemical and molecular analyzes were taken from the same lobe (right medial lobe). The collected sample was withdrawn from the area where the nodules were visible. The animals were killed at

the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, as described in the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines on Euthanasia [12].

2.2. Biochemical analysis

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) (U/L), aspartate aminotransferase (AST) (U/L) were determined by kinetic UV test. Gamma-glutamyl transferase (gamma-GT) (U/L), and alkaline phosphatase (AP) (U/L) were quantified by colorimetric kinetic test. They were measured using routine laboratory methods of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre by enzymatic method (automated – Siemens Advia 1800 Chemistry system).

2.3. Histology

For histological examination, a specimen of liver was trimmed and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 h. The blocks were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin wax. Serial 3- μ m sections were stained with hematoxylin and eosin and picosirius red.

The percentage of fibrosis (%) in the liver tissue was determined by morphometric measurements. Ten images from each slide were captured from randomly selected high-power fields (200 \times magnification) containing the

conjunctive tissue area positive. Morphometric assessment of the percentage of the ratios of conjunctive tissue relative to whole liver were performed using the Adobe Photoshop CS5 Extended 10.0 (Adobe Systems, San Jose, CA), according to the protocol described by Souza et al. [13].

2.4. Lipid peroxidation and cytosolic superoxide dismutase (SOD)

The livers were excised, weighed, and immediately frozen at -70°C . Frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Protein concentration in the liver homogenates was determined using a bovine albumin solution [14]. Lipid peroxidation was determined by measuring the concentration of TBARS (nmol/mg protein) [15]. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535 nm. Cytosolic SOD (EC 1.15.1.1) was assayed as described by Misra and Fridovich [16].

2.5. Western blot

Western blot analysis was performed on cytosolic extracts prepared by liver tissue homogenization in 140 mM NaCl, 15 mM EDTA (PubChem CID: 6049), 20 mM glycerol (10%), and a protease inhibitor cocktail [17]. The mixture was incubated on ice for 30 min and centrifuged for 30 min at 12,000 g and 4°C . The supernatant fraction was collected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration was measured by the Bradford assay [14]. Samples containing 50–100 μg of protein were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (9–12% acrylamide) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes [18,19]. The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4°C with polyclonal anti-TGF- β (SC31609/25 kDa), anti-eNOS (SC8311/140 kDa), anti-iNOS (SC7271/130 kDa), anti-NQO1 (SC376023/32 kDa), anti-Keap1 (SC 33569/69 kDa), and anti-Nrf2 (SC30915/57 kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200–1:1000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk, and anti-HSP70 (H5147/73 and 72 kDa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibody at 1:5000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk, and anti-GAPDH (G9545/37 kDa) antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibody at 1:1000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1:4000). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great Britain) [20]. The density of the specific bands was quantified with an L-Pix Chemi Molecular Imaging densitometer.

2.6. Statistical analysis

Means and standard deviations (SD) were calculated for all data. Significant differences between means were

evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). In the case of significance, Tukey's test was applied. *P* values <0.05 were deemed significant. All analyses were carried out using SPSS 18.0.

3. Results

3.1. Body weight and blood biochemical analyses

Rats with advanced HCC showed a slower growth rate than the PL and control animals, reaching at the time of sacrifice a body weight approximately 30% lower than that of controls, with a significant increase in the hepatosomatic ratio (Table 1). Blood analyses indicated that AST, ALT, AP and GGT levels were significantly higher in the advanced HCC group compared to control rats. Enzyme levels for the PL group also differed from those in control rats, although values were lower than those in the HCC group (Table 1).

3.2. Histology and morphometric study

The liver histology of animals in the advanced HCC group was characterized by chronic damage and areas of cellular atypia such as large nucleoli, increased nucleus to cytoplasm ratio and increased mitotic index at 19 weeks. The signs observed included lymphocytic infiltration, cells with enlarged nuclei, extremely atypical hepatocytes. Loss of normal hepatic parenchyma was present, with a pseudo-acinar and trabecular growth pattern. Moderate and large nodules were present (20% and 80% of rats, respectively) [21]. Animals in the group with precancerous lesions had developed early-stage HCC or preneoplastic lesions at 28 weeks. The liver histology in this group was consistent with multiple nodules of regeneration (small nodules in 100% of animals) and preneoplastic foci (Fig. 1). Distorted lobular architecture was also observed, with increased mitotic index and hepatocellular damage such as fibrosis and cirrhosis. The cytologic criteria included nuclear and cytoplasmic changes, multinucleation, centrally located nuclei, prominent nucleoli and increased cell density [22].

The percentage of fibrosis in the liver tissue was determined by morphometric measurement of picosirius red-stained samples. Data obtained indicate that the extent of fibrotic tissue increased slightly in rats with precancerous lesions and augmented markedly in animals with advanced HCC (control: 1.7 ± 0.1 ; precancerous lesions: 3.8 ± 1.5 ; advanced HCC: 12.3 ± 2.9 ; $p < .05$).

3.3. Markers of lipid peroxidation and SOD activity

Determination of lipid peroxidation in liver tissue was performed by the TBARS method, which showed a significant increase of malondialdehyde formation in both groups of DEN-treated rats. TBARS increased by 81% in the PL group when compared to control animals, while rats with advanced HCC had values approximately 25% lower than that of PL group. Liver activity of the antioxidant enzyme SOD was significantly increased in PL rats (+13%) and reduced in the advanced HCC group (–32%) when compared to control animals (Table 1).

Table 1
Effects of advanced HCC and precancerous lesions on body weight, hepatosomatic ratio, serum levels of AST, ALT, AP and GGT, hepatic TBARS and liver SOD activity.

	Control	Advanced HCC	Precancerous lesions
Initial weight (g)	146 ± 6	147 ± 7	154 ± 6
Final weight (g)	486 ± 8	323 ± 53 ^a	437 ± 26 ^b
HSR (%)	3.1 ± 0.2	12.4 ± 6.6 ^a	3.5 ± 0.4 ^b
AST (U/L)	102 ± 10	238 ± 70 ^a	160.5 ± 15 ^{a,b}
ALT (U/L)	49 ± 4	160 ± 27 ^a	71 ± 7 ^{a,b}
AP (U/L)	71 ± 12	249 ± 84 ^a	141 ± 57 ^{a,b}
GGT (U/L)	2.2 ± 0.9	113.8 ± 6.6 ^a	10.2 ± 1.7 ^{a,b}
TBARS (nmol/mg prot)	0.11 ± 0.02	0.16 ± 0.03 ^a	0.20 ± 0.02 ^a
SOD (U SOD)	12.7 ± 0.4	8.7 ± 1.8 ^a	15.9 ± 2.0 ^{a,b}

Values are expressed as means ± SD for 8–10 rats. HSR, hepatosomatic ratio; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyl transferase.

^a *p* < .05 vs. control.

^b *p* < .05 vs. advanced HCC.

3.4. TGF-1 β , Keap-1, Nrf2, NQO1, eNOS, iNOS and HSP70 expression

To evaluate the effects of early and advanced HCC on development of fibrosis, the expression of TGF-1 β was quantified by measurement of protein expression. Both PL and advanced HCC animals exhibited a significant induction of TGF-1 β , which reached a higher extent in the first group (+98%) (Fig. 2). Concerning markers

of inflammation, eNOS expression was reduced (–60%), whereas iNOS expression increased strongly in animals with advanced HCC (Fig. 2). Protein markers related to oxidative stress were also evaluated. The advanced HCC group exhibited a significant induction of NQO1 protein as compared with the control group (+82%). Rats in the PL group overexpressed nuclear factor Nrf2 (+260%), while in the advanced HCC group Nrf-2 expression was reduced (–56%) and Keap-1 was markedly overexpressed (+308%).

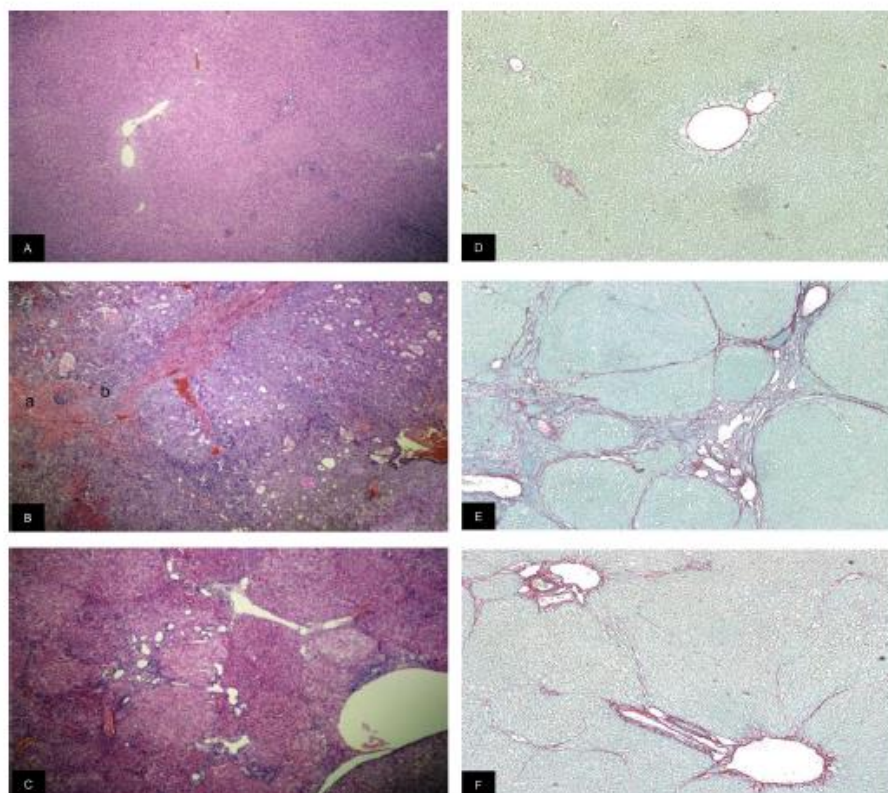


Fig. 1. Photomicrographs of liver sections. Left panels: tissue samples counter stained with hematoxylin-eosin. (A) Control: normal hepatic parenchyma. (B) Advanced HCC: non-cancerous cells (a) and atypical hepatocytes (b). Abnormal hepatic parenchyma was present, with a pseudo-acinar and trabecular growth pattern. (C) Precancerous lesions: low-grade dysplastic nodules (DN) and collagen deposition (black arrows) (Original magnification 40 \times). Right panels: tissue samples counter stained with picrosirius red. (D) Control: normal hepatic parenchyma. (E) Advanced HCC: intense deposits of fibrosis. (F) Precancerous lesions: moderated deposits of fibrosis (Original magnification 100 \times).

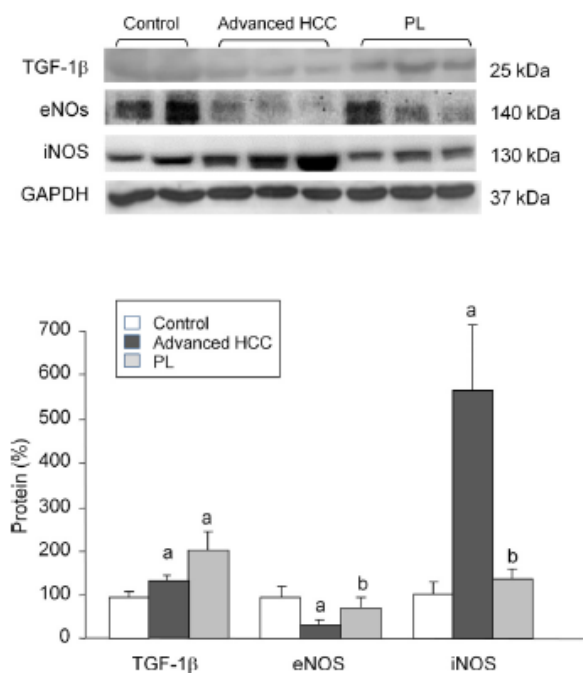


Fig. 2. Western blot analysis of TGF-1 β , eNOS, and iNOS. Protein from liver extracts was separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. (A) Representative images. (B) Densitometric quantification. Values are expressed as means \pm SD ($n=5$). ^a $p < .05$ vs. control; ^b $p < .05$ vs. advanced HCC.

Expression of the main isoforms of the HSP family (constitutive HSP 73 and stress-inducible HSP72) decreased significantly in animals with advanced HCC (–32% and –74%, respectively) (Fig. 3).

4. Discussion

This study provides evidence of the activation/inhibition of different proteins involved in oxidative stress and cell damage in a multistage animal model of hepatic carcinogenesis. Blood chemistry, liver histology, markers of oxidative stress and expression of different proteins related to HCC pathogenic mechanisms were measured in rats with early/precancerous lesions (PL) or late-stage HCC reached through different protocols of DEN administration.

DEN is a potent hepatocarcinogenic agent [23], which is hydrolyzed to nitrosamine, generating an electrophilic radical. The rats that were exposed most frequently to low doses of DEN had developed advanced HCC at 19 weeks, whereas animals exposed to high doses on fewer occasions developed preneoplastic lesions or early HCC by 28 weeks. In addition, we used 2-AAF on week 4 to inhibit the proliferation of normal hepatocytes [8,24]. With this design, HCC was already established by weeks 17–19 in the advanced HCC group, suggesting that the therapeutic window to address inflammation occurs on week 4 or 5, whereas cirrhosis is established by weeks 10–12.

Aminotransferase levels were significantly increased in the advanced HCC group. By week 19, there was an

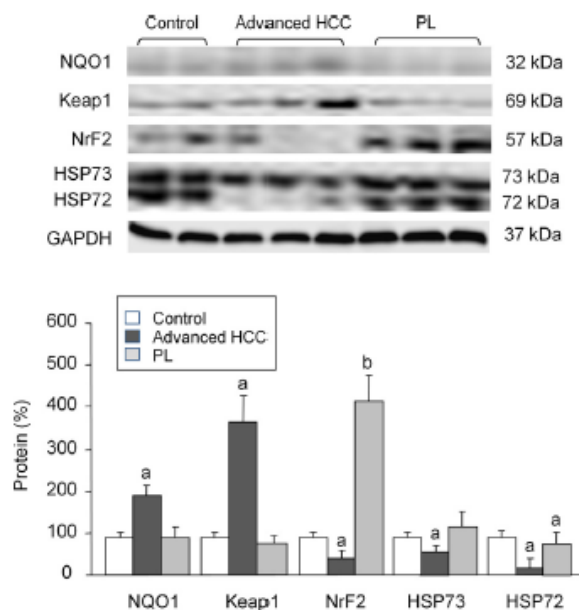


Fig. 3. Western blot analysis of NQO1, Keap1, Nrf2, HSP73 and HSP72. Protein from liver extracts was separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. (A) Representative images. (B) Densitometric quantification. Values are expressed as means \pm SD ($n=5$). ^a $p < .05$ vs. control, ^b $p < .05$ vs. advanced HCC.

elevation of both ALT and AST, indicative of liver injury and hepatocellular damage [25], reaching values similar to those previously reported in other models of progressive cirrhosis induced in rat by repeated injections of DEN [9,26]. Furthermore, AP was elevated concomitantly with a significant increase in the GGT level, which indicates the presence of obstructive and cholestatic disease. After analysis of the dimensions of the masses found, we believe that tumor nodules caused compression of the hepatic ducts. Both ALP and GGT have been confirmed as useful factor for confirmation of stages in HCC [10], and it is known that elevated GGT associates with increased cancer risk [27,28], seeming to be involved in the activation of pro-oncogenes or the inactivation of tumor-suppressor genes [29].

The effects of HCC stages on development of fibrosis were evaluated by quantifying TGF-1 β expression and percentage of fibrosis (%). TGF-1 β was significantly increased in all rats with precancerous lesions, while the intense deposits of fibrosis was more prominent in animals with advanced HCC. This result may suggest that the TGF-1 β is first activated in the early stage of HCC. Due to this activation, stellate cells (HSC) respond with intense deposits of fibrosis observed in the late stage of HCC. A strong association exists between fibrosis and HCC, because TGF-1 β is an important peptide mediator of hepatic stellate cells (HSC), which activate and stimulate matrix synthesis, leading to progressive liver failure [30]. A wealth of evidence suggests the existence of reciprocal signaling and positive feedback loop between precancerous hepatocytes and stellate cells. This cycle enhances the growth of hepatocytes and HSC activation, which promotes carcinogenesis by altering the stromal environment and promoting angiogenesis.

Furthermore, the accumulation of extracellular matrix would lead to increased proliferation and decreased apoptosis, favoring carcinogenesis [31]. TGF-1 β signaling in carcinogenesis is complex; in early-stage HCC, it acts as a tumor suppressor, but in the late phase it plays a role as a tumor promoter [61].

We also studied the behavior of the inflammatory mediator nitric oxide (NO), evaluating eNOS and iNOS expression in cytoplasmic extract of livers with advanced HCC and precancerous lesions. iNOS expression was increased in advanced HCC, whereas eNOS expression decreased significantly. Hanahan and Weinberg [32,33] have proposed six biological hallmarks necessary for tumor development. Overexpression of iNOS acts on three of these six markers. This occurs when overexpressed iNOS interacts on two important molecular pathways, IKK/NF-kappaB and RAS/ERK. Activation of these pathways triggers the transcription of genes that control cell growth, angiogenesis, and inhibition of cell death [34,35]. Regarding the role eNOS in carcinoma, Decker et al. [36] demonstrated that eNOS overexpression was associated with fewer and smaller tumor lesions as well as increased animal survival. However, eNOS $-/-$ knockout animals developed larger tumors and had worse survival. This vascular dysfunction in chronic liver disease is an important sign that precedes carcinoma [36].

After determination of proteins classically involved in chronic liver diseases, we assessed oxidative stress, by measuring the cytosolic concentration of TBARS and quantifying SOD activity. TBARS was already increased in the PL groups compared to controls. DEN is hydrolyzed in nitrosamine, generating the ethyl radical, responsible for an increase in intensification of oxidative stress. Many studies have linked oxidative stress to pathogenesis and disease prognosis [37–39]. One of the key factors in carcinogenesis is an imbalance of the redox state, favoring the formation of several toxic products such as malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, which can attack lipids, proteins and DNA, leading to carcinogenicity and mutagenicity [40,41]. In this study, SOD activity was reduced in advanced HCC, whereas increased in early HCC, signaling the presence of the superoxide anion. Similar results, showing increases in oxidative stress and reduction in SOD levels in animals with HCC have been previously reported, indicating that the decrease of SOD activity intensifies with the disease progression [8,42].

In addition to SOD activity, NQO1 expression was also determined. While SOD activity was significantly reduced in animals with advanced HCC, NQO1 protein expression increased significantly. Most solid tumors express high levels of NQO1 [43], and biochemical studies have shown that NQO1 is induced by numerous chemicals, including polycyclic aromatic hydrocarbons and azo dyes. Two regulatory elements responsible for the NQO1 gene are the antioxidant response element (ARE) and the xenobiotic response element (XRE) [44]. According to Venugopal and Jaiswal [45] an increase in NQO1 expression occurs in response to the generation of ROS caused by inflammation or xenobiotic exposure. Conversely, precancerous lesions showed augmented SOD activity with no increase in NQO1 protein expression. These findings suggest that NQO1 acts

directly as a superoxide anion scavenger, although less efficiently than SOD [46]. Its lack results in additional loss of protection against oxidative stress, exposing the cell to the aggressions of ROS. Tissues with high SOD levels and low NQO1 expression may have decreased clearance of superoxide anion, generating other reactive species and worsening liver injury [47].

In this study, Keap1/Nrf2 were assessed in animals with PL and advanced HCC. There is doubt as to whether Nrf2 is a tumor suppressor or oncogenic [48]. Under basal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by Keap1, but induction of oxidative stress is able to dissociate Nrf2 from Keap1, leading to its translocation to the nucleus and subsequent increase on antioxidant genes expression [49]. We observed that animals in late-stage (advanced) HCC showed Keap1 overexpression and Nrf2 downregulation compared to animals in the PL group. It is known that the Nrf2 system could be induced by chemical carcinogens [50]. Activation of this factor facilitates cytoprotection and contributes to the proliferation and survival of tumor cells, whereas its inhibition results in degradation [51,52], allowing an increase in ROS attacks to the cell. The role of Nrf2 is dependent on the stage of carcinogenesis. In the inflammatory phase, with precancerous lesions, increased activation of Nrf2 aims to reduce oxidative stress, thus contributing to tumor suppression [53]. Meanwhile, maintaining Nrf2

activation during the tumorigenesis stage may facilitate the transformation of dysplastic nodules into malignant cancer cells and make them resistant to treatment [53,54]. During the development of carcinoma, an increase in Nrf2 protein is associated with poor prognosis [48]. In our work, Nrf2 and Keap1 changes observed in both PL and HCC groups were in parallel with the changes on SOD activity, contributing to liver injury during hepatocarcinogenesis.

Another interesting finding from our investigation was the significant reduction in the expression of HSP70 in liver tissue with advanced HCC. HSP70 has strong cytoprotective effects and functions as a molecular chaperone in protein folding, transport, and degradation [55]. HSP70 downregulation is associated with carcinogenesis of the oral epithelium, and is a marker of HCC [56]. HSP70 downregulation also correlates with poor prognosis in breast cancer [57], endometrial cancer [58], and pancreatic cancer [56]. Rohde et al. [59] reported that HSP70 is not a condition for the growth of tumor cells, but plays an important role in maintaining the deregulated tumor cell cycle. Chuma et al. [60] evaluated the expression of HSP70 in liver tissue with and without cancer, and identified HSP70 as a molecular marker of HCC progression.

In conclusion, we have shown a multistage induction of HCC in rats through chronic and intermittent exposure to carcinogenic agents. Changes in SOD and Nrf2 and TGF-1 β stand out as markers of oxidative stress and cell damage in early HCC. TGF-1 β stimulates extracellular matrix formation and contributes to cell proliferation, SOD and Nrf2 overexpression act as cytoprotective factors in precancerous lesions. In advanced HCC, however, there is a decreased expression of HSP70, and an increase in the expression of NQO1 and iNOS, that interact with important genes controlling cell growth, angiogenesis and apoptosis. These results confirm that oxidative stress and fibrosis plays an

important role in liver carcinogenesis, suggesting that a multi-step process involving different molecular mechanisms could be implicated in the progression of chronic inflammatory liver diseases to HCC. Factors involved in oxidative stress and fibrosis can constitute not only potential biomarkers but also therapeutic targets for treatment of HCC.

Conflict of interest

The authors of this article declare that they have no conflicts of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS).

References

- [1] J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int. J. Cancer* 127 (2010) 2893–2917.
- [2] M. Cervello, G. Montalto, Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 5113–5121.
- [3] J. Bruix, L. Boix, M. Sala, J.M. Llovet, Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell* 5 (2004) 215–219.
- [4] D. Halegoua-De Marzio, H.W. Hann, Then and now: the progress in hepatitis B treatment over the past 20 years, *World J. Gastroenterol.* 20 (2) (2014) 401–413.
- [5] J. Bruix, M. Sherman, Management of hepatocellular carcinoma: an update, *Hepatology* 53 (3) (2011) 1020–1022.
- [6] A. Forner, J.M. Llovet, J. Bruix, Hepatocellular carcinoma, *Lancet* 379 (2012) 1245–1255.
- [7] E. Farber, D. Solt, R. Cameron, B. Laishes, K. Ogawa, A. Medline, Newer insights into the pathogenesis of liver cancer, *Am. J. Pathol.* 89 (1977) 477–482.
- [8] S. Malik, S. Bhatnagar, N. Chaudhary, D.P. Katare, S.K. Jain, DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights, *Protoplasma* 250 (2013) 175–183.
- [9] T. Nagahara, J. Okano, Y. Fujise, R. Abe, Y. Murawaki, Preventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats, *Biomed. Pharmacother.* 64 (2010) 319–326.
- [10] D.H. Park, J.W. Shin, S.K. Park, J.N. Seo, L. Li, J.J. Jang, M.J. Lee, Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat, *Toxicol. Lett.* 191 (2009) 321–326.
- [11] H. Yoshino, M. Futakuchi, Y.M. Cho, K. Ogawa, F. Takeshita, N. Imai, S. Tamano, T. Shirai, Modification of an in vivo lung metastasis model of hepatocellular carcinoma by low dose N-nitrosomorpholine and diethylnitrosamine, *Clin. Exp. Metastasis* 22 (2005) 441–447.
- [12] AVMA, AVMA Guidelines for the Euthanasia of animals: 2013 edition, 2013, pp. 1–102.
- [13] A. Souza, L. Meurer, T.R. Silveira, C. Gregorio, N. Reus, C. Uribe, U. Matte, J.L. Santos, Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia, *Pediatr. Res.* 75 (1) (2014) 22–28.
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [15] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302–310.
- [16] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [17] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [18] J.L. Mauriz, V. Molpeceres, M.V. García-Mediavilla, P. González, J.P. Barrio, J. González-Gallego, Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats, *J. Pineal Res.* 42 (2007) 222–230.
- [19] B. San-Miguel, M. Alvarez, J.M. Culebras, J. González-Gallego, M.J. Tuñón, N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure, *Apoptosis* 11 (2006) 1945–1957.
- [20] M.J. Tuñón, B. San-Miguel, I. Crespo, A. Laliena, D. Vallejo, M. Alvarez, J. Prieto, J. González-Gallego, Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin, *J. Pineal Res.* 55 (2013) 221–228.
- [21] B. Thoolen, F.J.W. Kate, P.J. Diest, D.E. Malarkey, S.A. Elmore, R.R. Maronpot, Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions, *J. Toxicol. Pathol.* 25 (2012) 189–199.
- [22] B. Thoolen, R.R. Maronpot, T. Harada, A. Nyska, C. Rousseaux, T. Nolte, D. Malarkey, W. Kaufmann, K. Küttler, U. Deschl, D. Nakae, R. Gregson, M. Vinlove, A. Brix, B. Singh, F. Belpoggi, J.M. Ward, Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system, *Toxicol. Pathol.* 38 (2010) 5S–81S.
- [23] G.M. Williams, M.J. Iatropoulos, C.X. Wang, N. Ali, A. Rivenston, L.A. Peterson, C. Schulz, R. Gebhardt, Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA damage, centrilobular cytotoxicity, cell proliferation and carcinogenesis in rat liver exhibit some non-linearities, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2253–2258.
- [24] T.V. Bagnyukova, V.P. Tryndyak, B. Montgomery, M.I. Churchwell, A.R. Karpf, S.R. James, L. Muskhelishvili, F.A. Beland, I.P. Pogribny, Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene, *Carcinogenesis* 29 (2008) 638–646.
- [25] J.L. Mauriz, B. Matilla, J.M. Culebras, P. González, J. González-Gallego, Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1236–1244.
- [26] B.C. Fuchs, Y. Hoshida, S. Fujii, L. Wei, S. Yamada, G.Y. Lauwers, et al., Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 59 (2014) 1577–1590.
- [27] B. Guiu, F. Deschamps, M. Boulon, V. Boige, D. Malka, M. Ducreux, P. Hillon, T. de Baère, Serum gamma-glutamyl-transferase independently predicts outcome after transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: external validation, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 35 (2012) 1102–1108.
- [28] A.M. Strasak, K. Rapp, L.J. Brant, W. Hilbe, M. Gregory, W. Oberaigner, E. Ruttman, H. Concin, G. Diem, K.P. Pfeiffer, H. Ulmer, V.a.P.S. Group, Association of gamma-glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study, *Cancer Res.* 68 (10) (2008) 3970–3977.
- [29] M.H. Hanigan, B.C. Gallagher, D.M. Townsend, V. Gabarra, Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo, *Carcinogenesis* 20 (1999) 553–559.
- [30] O.A. Gressner, R. Weiskirchen, A.M. Gressner, Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests, *Clin. Chim. Acta* 381 (2007) 107–113.
- [31] D.Y. Zhang, S.L. Friedman, Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis, *Hepatology* 56 (2012) 769–775.
- [32] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer review, *Cell* 100 (2000) 57–70.
- [33] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [34] M. Frau, F. Biasi, F. Feo, R.M. Pascale, Prognostic markers and putative therapeutic targets for hepatocellular carcinoma, *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 179–193.
- [35] J. Muntané, M.D. la Mata, Nitric oxide and cancer, *World J. Hepatol.* 2 (2010) 337–344.

- [36] N.K. Decker, S.S. Abdelmoneim, U. Yaqoob, H. Hendrickson, J. Hormes, M. Bentley, H. Pitot, R. Urrutia, G.J. Gores, V.H. Shah, Nitric oxide regulates tumor cell cross-talk with stromal cells in the tumor microenvironment of the liver, *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 1002–1012.
- [37] V.R. Vásquez-Garzón, J.R. Macías-Pérez, M.N. Jiménez-García, V. Villegas, S. Fattel-Fazenta, S. Villa-Treviño, The chemopreventive capacity of quercetin to induce programmed cell death in hepatocarcinogenesis, *Toxicol. Pathol.* 41 (2013) 857–865.
- [38] N. Kretzmann, H. Filmann, J.L. Mauriz, C.A. Marroni, N. Marroni, J. González-Gallego, M.J. Tuñón, Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 14 (2008) 1504–1513.
- [39] J.L. Mauriz, P. González, F. Jorquera, J.L. Olcoz, J. González-Gallego, Caspase inhibition does not protect against liver damage in hemorrhagic shock, *Shock* 19 (2003) 33–37.
- [40] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [41] L.L. De Zwart, J.H. Meerman, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 202–226.
- [42] J.L. Mauriz, P. Gonzalez, M.C. Duran, V. Molpeceres, J.M. Culebras, J. Gonzalez-Gallego, Cell-cycle inhibition by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma is mediated by a p53 and p21WAF1/CIP1 mechanism, *Transl. Res.* 149 (2007) 46–53.
- [43] D. Ross, H.D. Beall, D. Siegel, R.D. Traver, D.L. Gustafson, Enzymology of bioreductive drug activation, *Br. J. Cancer Suppl.* 27 (1996) S1–S8.
- [44] D. Ross, J.K. Kepa, S.L. Winski, H.D. Beall, A. Anwar, D. Siegel, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms, *Chem. Biol. Int.* 129 (2000) 77–97.
- [45] R. Venugopal, A.K. Jaiswal, Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 14960–14965.
- [46] D. Siegel, D.L. Gustafson, D.L. Dehn, J.Y. Han, P. Boonchoong, L.J. Berliner, D. Ross, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 1238–1247.
- [47] A.T. Dinkova-Kostova, P. Talalay, NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector, *Arch. Biochem. Biophys.* 501 (2010) 116–123.
- [48] M.B. Sporn, K.T. Liby, NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context, *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 564–571.
- [49] W.S. Jeong, M. Jun, A.N. Kong, Nrf2: A potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 99–106.
- [50] K.A. Jung, M.K. Kwak, The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants, *Molecules* 15 (2010) 7266–7291.
- [51] E. Kansanen, S.M. Kuosmanen, H. Leinonen, A.L. Levonen, The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer, *Redox Biol.* 1 (2013) 45–49.
- [52] W.M. Linehan, T.A. Rouault, Molecular pathways: fumarate hydratase-deficient kidney cancer—targeting the Warburg effect in cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 3345–3352.
- [53] H. Satoh, T. Moriguchi, J. Takai, M. Ebina, M. Yamamoto, Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis, *Cancer Res.* 73 (2013) 4158–4168.
- [54] M.C. Jaramillo, D.D. Zhang, The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer, *Genes Dev.* 27 (2013) 2179–2191.
- [55] S. Gupta, A. Deepti, S. Deegan, F. Lisbona, C. Hetz, A. Samali, HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction, *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000410.
- [56] S. Boonjaraspinyo, T. Boonmars, S. Kaewkes, P. Laummaunwai, S. Pinalor, W. Loilome, P. Yongvanit, Z. Wu, A. Puapairoj, V. Bhudhisawasdi, Down-regulated expression of HSP70 in correlation with clinicopathology of cholangiocarcinoma, *Pathol. Oncol. Res.* 18 (2012) 227–237.
- [57] A.C.h. Lazaris, E.B. Chatzigianni, D. Panoussopoulos, G.N. Tzimas, P.S. Davaris, B.C.H. Golematis, Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified, *Breast Cancer Res. Treat.* 43 (1997) 43–51.
- [58] K. Nanbu, I. Konishi, T. Komatsu, M. Mandai, S. Yamamoto, H. Kuroda, M. Koshiyama, T. Mori, Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. Correlation with clinicopathology, sex steroid receptor status, and p53 protein expression, *Cancer* 77 (1996) 330–338.
- [59] M. Rohde, M. Daugaard, M.H. Jensen, K. Helin, J. Nylandsted, M. Jäättelä, Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms, *Genes Dev.* 19 (2005) 570–582.
- [60] M. Chuma, M. Sakamoto, K. Yamazaki, T. Ohta, M. Ohki, M. Asaka, S. Hirohashi, Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 37 (2003) 198–207.
- [61] M. Sakamoto, K. Effendi, M. Yohei, Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis, *Jpn J Clin Oncol* 40 (9) (2010) 891–896.

4.2 Resultados do Experimento II (CEP/ FIPE/ HCPA 140311)

Realizamos nova indução de CHC com DEN + 2-AAF para avaliar os efeitos da melatonina durante a carcinogênese. Neste novo experimento só utilizamos o protocolo DEN50, pois foi o que desenvolveu o CHC avançado. Os resultados do Experimento II foram submetidos para a publicação sob forma dos artigos baixo:

Artigo 2: Melatonin attenuates oxidative damage in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats, submetido para Toxicologic Pathology. Este artigo responde os seguintes objetivos específicos do Experimento II:

Avaliar a relação hepatossomática dos animais submetidos à carcinogênese com e sem Melatonina.

Avaliar as enzimas de integridade hepática mediante a quantificação de AST, ALT, FA e γ GT dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

Avaliar os aspectos macroscópicos do fígado dos animais submetidos à carcinogênese com ou sem Melatonina;

Avaliar aspectos histológicos do fígado pela coloração HE dos fígados dos animais submetidos à carcinogênese e tratados com ou sem Melatonina;

Determinar a reação ductular: pela positividade da citoqueratina 7 (pCK7) no tecido hepático de animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;

Determinar o dano ao DNA (mutagenicidade) do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;

Determinar o estresse oxidativo do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina mediante a avaliação de TBARS, da atividade de enzima antioxidante (SOD) e da expressão do fator nuclear Nrf2, seu inibidor KEAP1 e da proteína NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1);

Determinar expressão de fator nuclear κ B do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

Melatonin attenuates oxidative damage in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats

Andrea Janz Moreira,^{1,2,5} Graziella R Rodrigues,¹ Silvia Bona,¹ Carlos Thadeu Cerski,^{1,3} Jaqueline Nascimento Picada,⁷ Claudio Augusto Marroni,⁴ José L Mauriz⁶, Norma Possa Marroni.^{1,2,7}

Andrea Janz Moreira ^{1,2,5} andreacjmoreira@gmail.com

Graziella R Rodrigues ¹ graziellarodrigues@gmail.com

Silvia Bona¹ silvia.rbona@gmail.com

Carlos Thadeu Cerski ^{1,3} thadeu@kcm.com.br

Jaqueline Picada ⁷ jnpicada@cpovo.net

Claudio Augusto Marroni ⁴ normap.marroni@gmail.com

José L Mauriz⁶ jl.mauriz@unileon.es

Norma Possa Marroni ^{1,2,7} nmarroni@terra.com.br

1 Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos, 2400 - Porto Alegre - RS - Brazil.

2 Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Rua Sarmento Leite, 500 - Porto Alegre - RS - Brazil.

3 Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Rua Ramiro Barcelos, 2400 - Porto Alegre - RS - Brazil.

4 Program in Liver Diseases, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Brazil

5 Metodista University Center – Institute of Porto Alegre, Rua Joaquim Pedro Salgado 80, Porto Alegre/ Brazil.

6 Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), León, Spain

7 Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil - Av. Farroupilha, 8001- Canoas - RS - Brazil.

Running title: Melatonin and oxidative damage in HCC

Corresponding author:

Dr. Norma Possa Marroni

Rua José Kanan Aranha, 102 - Porto Alegre - RS - Brazil

CEP: 91760470

Phone: (55) (51) 99643011 / Fax: (55) (51) 32483202

Email: nmarroni@terra.com.br

ABSTRACT

The relation between reactive oxygen species (ROS) and development of hepatocellular carcinoma (HCC) has been widely discussed. ROS may cause damage to lipids, proteins and DNA, producing genetic mutation and abnormal cell growth. However, it seems that solid tumors are resistant to lipid peroxidation in the later stages. There is evidence suggesting the involvement of ROS in the induction of carcinogenesis. Melatonin (MEL) is a lipophilic indoleamine, associated with antioxidative defense, anti-inflammatory and oncostatic systems. Our goal was to investigate the effects of melatonin on oxidative stress in an animal model of liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine + acetylaminofluorene (DEN+2AAF) and its impact on the development of HCC. Rats in treatment groups received diethylnitrosamine (DEN) 50mg/kg intraperitoneally once or twice a week for 19 weeks. Melatonin was given in drinking water at 1mg/kg/day, beginning 5 or 12 weeks after the start of DEN administration. Animals receiving MEL exhibited precancerous lesions, less intense ductular reactions, normal values for liver enzymes, down-expression of NFκB (p65) and iNOS and overexpression of eNOS and Nrf2. These conditions were predictive of the attenuation in the formation of liver tumor. Melatonin appears to have the ability to control hepatocarcinogenesis, delaying the development of HCC in rats.

Key words: Nrf2, NFκB, Animals Models, Antioxidants, hepatocellular Carcinoma

1 Introduction

Carcinogenesis is characterized by a multistage process involving several molecules and cellular events which transforms a normal cell into a malignant, neoplastic one (Hanahan and Weinberg, 2011). The stages of this process are known as initiation, promotion and progression. Initiation is associated with DNA damage, while promotion is linked to the modulation of gene expression. The hallmarks of promotion stage are increased cell division and reduced apoptosis as well as strong stimulus to growth factors. Growth factors can encourage cell expansion, contributing to clonal expansion and formation of a tumor. This occurs in the progression stage (Hanahan and Weinberg, 2011). Genotoxic agents can promote mutation in a normal cell. Moreover, they can generate reactive oxygen species (ROS) in high concentrations. ROS are able to oxidize macromolecules or activate transcription factors such as NF κ B and Nrf2. In addition, initiation occurs concomitant with the development of the inflammatory process (Klaunig, Kamendulis, Hocevar, 2010).

Formation of hepatocellular carcinoma (HCC) is the result of several inflammatory assaults, chemical agents and chronic diseases. Such diseases include alcoholic cirrhosis, hepatitis B or C virus (HBV and HCV) infection, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), α 1-antitrypsin deficiency, hemochromatosis and tyrosinemia (Bruix et al., 2004). Many studies have demonstrated the presence of overproduction of ROS in inflammatory chronic diseases (Subramanian et al., 2007; Moreira et al., 2015). The relationship between ROS and development of HCC has been widely discussed. Oxidative stress may cause damage to lipids, proteins and DNA, producing chromosome instability and abnormal cell growth. However, it seems that solid tumors are resistant to lipid peroxidation in the later stages (Subramanian et al., 2007; Moreira, et al., 2015; Masotti, Casali, Galeotti, 1988; Canuto et al., 1991). It is believed that ROS are responsible for tumor initiation. There is evidence suggesting the involvement of ROS in the induction of carcinogenesis. Therefore, reducing the generation of ROS would be a way to slow the progression of liver tumor (Sánchez-Pérez et al., 2005; Reiter, 2004).

Melatonin–N-acetyl-5-methoxytryptamine is a lipophilic indoleamine derivative of tryptophan. It is produced primarily by the pineal gland of vertebrates, but is also present in other organs (Reiter and Tan, 2002; Reiter et al., 2007). Melatonin (MEL) is associated with effects on sleep, mood, sexual maturation and reproduction, immune function, aging,

and the antioxidative defense system (Allegra et al, 2003; Mills et al., 2005). Melatonin performs numerous actions, including protection from oxidative damage (Reiter, 2004), anti-angiogenic activity (Lissoni et al., 2001), anti-inflammatory activity (Lissoni et al 1997) and oncostatic effects. The oncostatic properties of melatonin in many tumors have been widely studied, principally in breast, colon and ovarian cancers (Mills et al., 2005; Blask et al., 2002; Carbajo-Pescador et al., 2011; Carbajo-Pescador et al, 2013).

Our goal was to investigate the effects of melatonin on oxidative stress in an animal model of liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine + acetylaminofluorene (DEN+2AAF) and its impact on the development of HCC

2 Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

Male Wistar rats weighing ± 150 g were used for this study and were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The rats were caged individually at 24°C, with a 12 h light-dark cycle and had free access to food and water until the time of the experiments in the Animal Experimentation Division of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. All experiments were performed in accordance with the *Guiding Principles for Research Involving Animals* (NAS) protocol number 140311.

HCC was induced by a chronic and intermittent model of exposure to carcinogenic agents (50 mg/Kg i.p. diethylnitrosamine – DEN and 100 mg/kg i.p. and 2-acetylaminofluorene - 2-AAF, both from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The administration of DEN followed the protocol: 1st to 3rd and 5th weeks: DEN 2x per week (50 mg/kg i.p.); 4th week: DEN (50 mg/Kg i.p.) + 2-AAF (100 mg/kg i.p.); 6th week: DEN 1x per week (50 mg/Kg i.p.); suspension for four weeks; 11th to 13th weeks: DEN 1x per week (50 mg/Kg i.p.); and euthanasia at 19 weeks (Moreira et al, 2015). The animals were divided into four groups: (I) Control (CO); (II) Diethylnitrosamine + 2-AAF (DEN-HCC); (III) Diethylnitrosamine + 2-AAF + melatonin from the 5th to the 19th week (DEN+MEL5W) and (IV) Diethylnitrosamine + 2-AAF + melatonin from the 12th to the 19th week (DEN+MEL12W). Melatonin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) was prepared three times a week by dissolving the drug (16 mg) in ethanol (200 μ L, 100%, vol/vol). This solution was then diluted with drinking water to a final concentration of 20

mg/L. Melatonin was administered daily for 90 days (group III) or 45 days (group IV) and water bottles were covered with aluminum foil. The rats drank about 25 mL/day, and the average daily intake of melatonin was estimated to be 1 mg/kg/day, which was expected to increase normal plasma melatonin levels 20–30 times (Molpeceres et al., 2007; De Butte and Pappas, 2007; Rasmussen et al., 1999).

After fasting for 12 hours, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketalar® 100 mg/kg) and xylazine (50 mg/kg) and subjected to blood collection for biochemical analysis. Liver samples were taken—always from the same lobe—for histological analysis, comet assay, and determination of oxidative stress. The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, as described in the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia (AVMA 2013).

2.2 Biochemical analysis

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) (U/L), aspartate aminotransferase (AST) (U/L), gamma-glutamyl transferase (γ GT) (U/L), and alkaline phosphatase (AP) (U/L) were measured, using routine laboratory methods of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, by the enzymatic method (automated – Siemens Advia 1800 Chemistry system).

2.3 Histology and immunohistochemical analysis, sample preparation and image capture

For histological examination, a liver sample was trimmed and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours. The blocks were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin wax. Serial 3- μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and imaged (40x magnification). The analyses were performed by a blinded evaluator.

For immunohistochemical analysis, slides of the liver were drained and incubated with anti-cytokeratin 7 (CK7) (1:50 dilution, Ab9021 Abcam) for 1 h at room temperature. For morphometric measurements, 10 images from each slide were captured from randomly selected high-power fields (200x magnification) containing CK7-positive structures. Morphometric assessment of the percentage of CK7-positive area (pCK7- %) was performed using Adobe Photoshop CS5 Extended 10.0 (Adobe Systems, San Jose,

CA) as described in Souza et al., (2014). The analyses were performed by a blinded evaluator.

2.4 Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al., (2000) with minor modifications (Hartmann et al., 2003). Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicated slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal and consequently for each studied group. Therefore, the damage index (DI) ranges from 0 (no damage, 100 cells x 0) to 400 (maximum damage, 100 cells x 4).

2.5 Lipid peroxidation

The livers were excised, weighed, and immediately frozen at -70°C . Frozen tissue from each rat was homogenized in an ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Protein concentration in the liver homogenates was determined using a bovine albumin solution (Lowry et al., 1951). Lipid peroxidation was determined by measuring the concentration of TBARS (nmol/mg protein) (Buege and Aust, 1978). Spectrophotometric absorbance in the supernatant was determined to be 535 nm.

2.6 Protein carbonyl content

Protein carbonyl formation, a marker of protein damage, was measured according Protein Carbonyl Content Assay Kit via spectrophotometric absorbance at 375nm (MAK094 Sigma-Aldrich, USA). The results were calculated as nmol of carbonyls/mg protein.

2.7 Cytosolic superoxide dismutase (SOD)

Cytosolic SOD (EC 1.15.1.1) was assayed as described by Misra and Fridovich (1972). The rate of autooxidation of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, is monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibits epinephrine autooxidation at 50% of the maximum inhibition is defined as 1 U of SOD activity.

2.8 Western blot

Western blot analysis was performed on nuclear and cytosolic extracts prepared by liver tissue homogenization in 140 mM NaCl, 15 mM EDTA, 20 mM glycerol (10%) and a protease inhibitor cocktail (Laemmli, 1970). The mixture was incubated on ice for 30 min and centrifuged for 30 min at 12,000 g and 4 °C. The supernatant fraction was collected and stored at -80 °C in aliquots until use. Protein concentration was measured by the Lowry assay (Lowry et al., 1951). Samples containing 50-100 µg of protein were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (9-12% acrylamide) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Mauriz et al., 2007). The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature. They were kept overnight at 4 °C with polyclonal anti-p65 (nuclear extract SC8008/65 kDa), anti-eNOS (SC8311/130 kDa), anti-iNOS (SC7271/120 kDa), anti-NQO1 (SC376023/31 kDa), anti-Keap1 (SC33569/70 kDa) and anti-Nrf2 (nuclear extract SC30915/57 kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200-1:1,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk, and anti-GAPDH (G9545/35 kDa) antibodies (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at 1:200-1:1,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP-conjugated antibodies. Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great Britain) (San Miguel et al., 2013). The density of the specific bands was quantified with an L-Pix Chemi Molecular Imaging densitometer.

2.9 Statistical Analysis

Means and standard deviation (SD) were calculated for all data. Significant differences between means were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was also applied. P values < 0.05 were deemed significant. All analyses were carried out in SPSS 18.0.

3 Results

3.1 Animals

The animals receiving DEN showed a slower growth rate than the control animals. The average weights of the animals at the end of the study showed a difference between the II, III, and IV groups and the control group, with presence of cachexia in animals with DEN. They had a final weight approximately 30% lower than that of the controls ($p < 0.05$) (Table 1). Melatonin treatment failed to reverse this weight loss. We observed that 90% of the animals exposed to DEN developed HCC at 19 weeks while only 25% of the animals exposed to DEN and treated with melatonin developed HCC (Log Rank (Mantel-Cox) Chi-Square 12.923 and significance .000/ Log-Rank test of equality of survival distributions for the different levels of Melatonin).

3.2 Biochemical Analysis

Analyses of transaminase enzymes in group II showed increases in AST and ALT compared to groups I, III and IV. Group II also demonstrated significant increases in AP and γ GT compared to groups I, III and IV. Animals treated with melatonin showed enzyme levels similar to controls (Fig. 1).

3.3 Histology analysis

In group II, the liver histology was characterized by advanced HCC (Fig.2B). Abnormal hepatic parenchyma was present with pseudoacinar and trabecular growth patterns. The cytologic criteria include nuclear and cytoplasmic changes, centrally located nuclei, prominent nucleoli and increased cell density. Groups III and IV showed low-grade dysplastic nodules, precancerous lesions (PL) and cirrhosis (Fig. 2C, 2D).

The ductular reaction was evaluated by the percentage of CK7 positivity (pCK7). We observed greater positivity in animals with advanced HCC (Fig 2F), but in animals treated with melatonin the ductular reaction was similar to controls (pCK7: CO: 1.2%; DEN-HCC: 17%; DEN+MEL 5W: 3.2%; DEN+MEL 12W: 3%) (Fig. 2G, 2H).

3.4 Comet assay

There was significant increase ($p < 0.05$) in the damage index to liver DNA in DEN groups compared to group I, indicating the genotoxic effect of DEN in this tissue. Groups III and IV showed a significantly lower damage index ($p < 0.05$) (Fig. 3D).

3.5 Markers of oxidative stress

Determination of lipid peroxidation in liver tissue with tumor (DEN-HCC group) and precancerous lesions (DEN+MEL groups) was performed using the TBARS method, which showed an increase of malondialdehyde (MDA) formation in tissues exposed to DEN, but lipid peroxidation was significantly increased in the DEN+MEL5W and DEN+MEL12W *versus* control animals. DEN-HCC group had LPO approximately 25% lower than that of groups III and IV (Fig. 3A). Group II showed higher levels of protein carbonyls (increased by 55% *versus* control group). Groups III showed a significantly lower levels of protein carbonyls (-30% *versus* DEN-HCC group) (Fig 3B).

The SOD activity was strongly increased in DEN+MEL groups compared to the control. SOD activity in the DEN+MEL5W group increased by 300% *versus* the control group. (Fig. 3).

3.6. *p65, iNOS, eNOS, Keap-1, Nrf2, NQO1* expression

Expression of NF κ B/p65 and iNOS, which is indicative of inflammation, was strongly increased in animals treated with DEN (+35% and +100% respectively), while the DEN+MEL5W and DEN+MEL12W groups had expression similar to the control group (Fig. 4). Expression of eNOS was reduced in the DEN-HCC group (-50%) as compared with the control group (Fig. 4). Protein markers related to oxidative stress were also evaluated. Animals in the DEN-HCC group underexpressed nuclear factor Nrf2 (-40%). Conversely, animals in groups III and IV overexpressed Nrf2 (+40% and +100% respectively). The DEN animals with advanced HCC (group II) exhibited high induction of the NQO1 protein (+80%) compared to the control group. (Fig. 4).

4 Discussion

We evaluated the efficacy of melatonin a protector of macromolecules against oxidative damage during the carcinogenesis process in animals exposed to DEN. In general, melatonin was competent in improving the state of the hepatic enzymes, the histological aspect, and reducing the damage index of DNA of the liver compared with group II. The livers of the DEN + melatonin animals contained smaller tumors and precancerous lesions than DEN-HCC.

Regarding oxidative damage, melatonin increased antioxidant enzymes, reduced the effect of ROS on DNA and protein, and also protected and kept the membrane lipid

substrate. Meanwhile, DEN-HCC animals lost considerable lipids and suffered intense damage to proteins and DNA. We evaluated four parameters: biochemical analysis, histological aspects, liver DNA damage index and oxidative damage in macromolecules.

After 19 weeks, 90% of animals DEN-HCC group developed tumor masses, while melatonin treated animals developed precancerous lesions. This suggests that the melatonin treatment was effective in preventing or delaying the development of HCC experimentally.

DEN and 2-AAF are considered potent carcinogens. DEN, when hydrolyzed, generates a monovalent ethyl radical, and when associated with 2-AAF is responsible for the formation of DNA adducts (Williams et al., 1996; Malik et al., 2013; Bagnyukova et al., 2008; Poirier, 2002). Melatonin slowed tumor formation; it played the role of a cytoprotective drug, protecting the cell from oxidative damage and the genotoxic effects (Imaida et al., 2000). Many studies report oncostatic effects of melatonin (Subramanian et al., 2007; Blask, Dauchy, Sauer, 2005; Anisimov et al., 2006; Tomas-Zapico and Coto-Montes, 2005). These effects are associated with inhibition of tumor, ability to repair DNA damage, proapoptotic effects and regulation of nuclear factors and growth (Subramanian et al., 2007).

The toxicity promoted by the carcinogenic agents was attenuated by melatonin, and this was reflected in reduced values of hepatic enzymes. The DEN+MEL animals had normal liver enzyme patterns. Low values of AST and ALT mean less hepatocellular injury, lower incidence of necrosis, and less chance of cell membrane permeability. DEN-HCC group exhibited increased AST and ALT, which is indicative of acute liver injury and hepatocellular damage (Mauriz et al., 2001). Group II showed high γ GT and AP levels, which indicates cholangitis as well as obstructive and cholestatic disease. Elevated γ GT is associated with increased cancer risk (Guiu et al., 2012; Strasak et al., 2008) and seems involved in the activation of pro-oncogenes or the inactivation of tumor-suppressor genes (Hanigan et al., 1999). Treated animals had reduced levels of γ GT and the DEN+MEL12W group showed the greatest reduction. These findings are consistent with the lowest positivity for CK7 and reduction of the enzymes AP and γ GT, restoring the function of the bile ducts.

Tumors of hepatocellular cells have the ability to express cytokeratin. This may contribute to elevated levels of γ GT in HCC (Van Eyken et al., 1988; Gould, 1986). The ductular reaction evidenced by the increased CK7 positivity could explain the increase in γ GT levels in group II. These data suggest that the presence of ductular reactions, including changes in cytoskeletal structure (Desmet, 2011), may be associated with complications of liver cancer. Zhang et al. (2013) showed that this ductular reaction in the initial HCC was smaller when compared with advanced HCC. Our results suggest that melatonin protected hepatocytes and reduced ductular reaction.

Group II showed poorly differentiated HCC with abnormal hepatic parenchyma. The tumoral cells are surrounded by fibrous hyaline bands. The cytological criteria include increased nuclear/cytoplasmic ratio, rounded nuclei, prominent nucleoli, and increased cell density (Thoolen et al., 2010). This study observed that DEN+MEL animals had dysplastic nodules and cirrhosis characterized by precancerous lesions. All the control animals showed normal histological analysis (Guiu et al., 2012; Strasak et al., 2008; Thoolen et al., 2010; Paradis, 2013).

We evaluated the damage index (DI) in liver DNA by comet assay. This assay evaluates the genotoxic effect of DEN on hepatic tissue. The animals in group II showed more DI. DEN+2-AAF caused DNA damage and strong genotoxic effects, resulting in DNA adducts (El Mesallamy et al., 2011; Verna, Whysner, Williams, 1996; Srinivasan et al., 2008). These lesions induce hepatocarcinogenesis. Melatonin protected against DNA damage, reduced the formation of ROS and DNA adducts (Liu et al., 2013). Our results demonstrated that DEN+MEL5W and 12W significantly reduced the damage index in liver DNA.

Melatonin has been shown to increase the efficiency of the electron transport chain and, as a consequence, to reduce electron leakage and the generation of free radicals (Anisimov et al., 2006; Reiter et al., 2001). In these analyses we can see that melatonin acted to reduce the expression of iNOS and increase eNOS, reversing the vascular dysfunction present in chronic liver diseases. Just as significantly, it attenuated the expression of p65, reducing inflammation and stopping maintenance of activated pro-tumor pathways. There is evidence that melatonin stabilizes microsomal membranes, thereby probably helping them resist oxidative damage (Karbownik et al., 2001). Melatonin controlled the inflammation and was effective in attenuating the tumor

initiation stage, thus resulting in delay of HCC development. Regulating NF κ B expression allows acting along numerous pathways involved in carcinogenesis, among them cell proliferation via MAPK signal pathways; angiogenic pathways by HIF/VEGF; inflammatory pathways by COX2-iNOS; and apoptotic pathways (Hanahan and Weinberg, 2011). Again, better results occurred in the DEN+MEL12W group compared to DEN+MEL5W group.

Our results showed that the lipid peroxidation (LPO) was reduced in animals with advanced HCC. This suggests that disruption of the redox status affects the rate of proliferation of tumor cells, which in turn can stimulate cell division and promote tumor growth (Subramanian et al., 2007; Canuto et al., 1991; Srinivasan et al., 2008). LPO is characterized by the oxidation of lipids. The main targets of free radicals are the polyunsaturated fatty acids present in the cell membrane, for example arachidonic acid (Canuto et al., 1991). It is believed that in hepatoma cells, arachidonic acid comprises 11% of the total fatty acids, while in hepatocytes, the percentage is 23 (Canuto et al., 1991). LPO participates in important physiological roles, such as cellular aging and control of mitogenic activity (Masotti, Casali, Galeotti, 1988; Tappel, 1980).

Animals that developed HCC showed less LPO compared to animals with precancerous lesions. Canuto et al. (1991) reported that the decrease in polyunsaturated fatty acid content in tumor cells could explain the pattern of low values of LPO. The reduced rate of polyunsaturated fatty acids in the cell membranes of hepatoma compared to the membranes of hepatocytes is a possible cause of reduced LPO. Halliwell and Gutteridge (1989) reported that reactions involving LPO are complex, and are associated with cell growth rate. Many studies showed that advanced solid tumors exhibit low LPO (Subramanian et al., 2007; Moreira et al., 2015; Masotti, Casali, Galeotti, 1988) and this is associated with cell growth rate (Subramanian et al., 2007; Masotti, Casali, Galeotti, 1988). In vitro, a study using oxidizing agents on the tumor cells caused a decrease in the viability of these cells (Speclor and Burns, 1987).

Several authors have associated LPO cell growth processes. They observed that tissues with increased cell growth rate - such as in fetuses, neonates and tumors - showed resistance to LPO. There is evidence that peroxidation of lipids is able to regulate the mitotic activity of the cell by means of its by products, which may interfere with DNA synthesis. It is believed that this mechanism of regulation is anomalous in cells that divide

rapidly. In summary, in normal cells, LPO interferes with and inhibits cell division; whereas, in tumor cells, the change occurs in the lipid composition of the cell membrane, which results in lower LPO. The reduction in LPO increases tumor growth rate (Masotti, Casali, Galeotti, 1988; Wolfson, Wilbur, Bernheim, 1956; Cole, 1956). Melatonin restores the redox equilibrium affecting cell growth rate. These effects slow the promotion and progression stages of tumor.

The proteins evaluated to study the oxidative system were Keap1, Nrf2 and NQO1. Under stress conditions, Nrf2 is able to dissociate from the Keap1, leading to its translocation to the nucleus and subsequent increase on antioxidant genes expression (Jeong, Jun, Kong, 2006). We observed that animals with advanced HCC exhibited more expression of the Keap1 inhibitor and less activation of the Nrf2 factor. DEN + MEL animals exhibited a pattern of lower expression of the cytoplasmic inhibitor Keap1 and greater expression of Nrf2 factor. This may suggest that the cytoprotective system is triggered under these conditions. As a result, the DEN + MEL animals had a strong increase in SOD activity compared to DEN-HCC animals. Melatonin is considered a potent scavenger, and acts synergistically, stimulating the antioxidant enzyme system and reinforcing the cytoprotective effect, reducing DNA damage (Reiter, 2004). One interesting fact recorded in this study was an increase in NQO1 expression in animals with advanced tumors. There are two explanations. The first is associated with the presence of tumor and the other is xenobiotic. It is reported that in baseline conditions, NQO1 expression is extremely low, but in the presence of solid tumors, its expression is stimulated (Siegel, Yan, Ross, 2012). Another explanation could be connected to the xenobiotics used, which may have been able to activate the xenobiotic responsive element (XRE) or electrophile responsive element (EpRE) that also regulates the expression of this enzyme (Siegel, Yan, Ross, 2012; Dinkova-Kostova, Talalay, 2010; Hayes et al., 2003).

The lower activity of antioxidant enzymes observed in tumors is due to oxidation of proteins and enzymes, as confirmed by the high values of protein carbonyls of group II. Our results showed that SOD activity was increased in the DEN + MEL groups. Melatonin acts as direct scavenger of free radicals. It may play an important role in defending cells from genotoxic agents, reducing DNA damage and oxidative mutagens (Anisimov et al., 2006). Melatonin regulates antioxidant enzyme activity, controlling its

stimulation and synthesis, enhancing the cytoprotective system (Cemeli, Baumgartner, Anderson, 2009).

In conclusion, our data suggest that rats exposed to DEN formed advanced tumors and did not activate the Keap1-Nrf2 cytoprotective complex. Failure in cytoprotection and the increase in the generation of ROS are involved in liver carcinogenesis by changing the cellular redox state, which contributes to tumor formation. While, melatonin-treated animals showed precancerous lesions, increases in LPO, intense SOD activity, activation of Keap1-Nrf2 cytoprotective complex and absence of ductular reaction. Melatonin appears to have the ability to control hepatocarcinogenesis, delaying the development of HCC in rats.

Acknowledgements. We wish to thank Dra Juliana da Silva for the important contribution to the understanding of the comet assay and genotoxic effects. This study was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS). CIBERehD is funded by Instituto de la Salud Carlos III.

Conflict of Interest. The authors of this article declare that they have no conflicts of interest.

References

- Allegra, M., Reiter, R. J., Tan, D. X. et al., (2003) The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res*, 34:1–10.
- Anisimov, V. N., Popovich, I. G., Zabezhinski, M. A. et al., (2006) Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta*, 1757:573–589.
- AVMA Guidelines for the Euthanasia of animals: (2013) edition pp. 1-102.

- Bagnyukova, T. V., Tryndyak, V. P., Montgomery, B., Churchwell, M. I., Karpf, A. R., James, S. R., Muskhelishvili, L., Beland, F. A. and Pogribny, I. P. (2008) Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis*, 29, 638-46.
- Blask, D. E., Sauer, L. A., Dauchy, R. T. (2002) Melatonin as a chronobiotic/ anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadianbased cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2:113–132.
- Blask, D.E., Dauchy, R. T., Sauer, L. A. (2005) Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine*, 27:179–188.
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M. and Llovet, J. (2004) Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell*, march, vol 5: 215-219
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* V52, 302-309.
- Canuto, R., Muzio, G., Biocca, M. and Dianzani, M. (1991) Lipid Peroxidation in Rat AH-130 Hepatoma Cells Enriched in Vitro with Arachidonic Acid. *Cancer Research*, 51, 4603-4608.
- Carbajo-Pescador, S., Ordoñez, R., Benet, M., Jover, R., García-Palomo, A., Mauriz, J. L. and González-Gallego, J. (2013) Inhibition of VEGF expression through blockade of HIF1alpha and STAT3 signaling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109, 83-91.
- Carbajo-Pescador, S., Palomo, A., Renedo, J., Piva, M., Gonzalez-Gallego, J. and Mauriz, J.L. (2011) Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor, *J. Pineal Res.*, 51: 463-471.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D. (2009) Antioxidants and the comet assay. *Mutation Research*, 681, 51–67.
- Cole, B. T. (1956) Oxidation of unsaturated fatty acids in embryonic and adult tissues of Golden hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93:290-294.
- De Butte, M., Pappas, B. (2007) Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin supplementation. *Neurobiol Aging*, 28:306–313.
- Desmet, V. (2011) Ductal plates in hepatic ductular reactions. *Virchows Arch*, 458, 251-259.
- Dinkova-Kostova, A., Talalay, P. (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 116–123.

- El Mesallamy, H., Metwally, N., Soliman, M.S., Ahmed, K., Moaty, M. M. (2011) The chemopreventive effect of Ginkgo biloba and Silybum marianum extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Int*, 11: 38.
- Gould, V.E. (1986) Histogenesis and differentiation: a re-evaluation of these concepts as criteria for the classification of tumors. *Hum Pathol*, 17: 212-5.
- Guiu, B., Deschamps, F., Boulin, M., Boige, V., Malka, D., Ducreux, M., Hillon, P., de Baère, T. (2012) Serum gamma glutamyl transferase independently predicts outcome after transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: external validation. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 35, 1102-8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radical Bio Med*, second edition, Oxford, Clarendon Press.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Hanigan, M. H., Gallagher, B. C., Townsend, D. M., Gabarra, V. (1999) Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis*, 20: 553-9.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A. et al., (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *4th International Comet Assay Workshop. Mutagenesis*, 18:45–51.
- Hayes, J., McMahon, M., Chowdhry, S. and Dinkova-Kostova, A. (2003) Cancer Chemoprevention Mechanisms Mediated Through the Keap1–Nrf2 Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol (13), Number 11, 1713-1748.
- Imaida, K., Hagiwara, A., Yoshino, H. et al., (2000) Inhibitory effects of low doses of melatonin on induction of preneoplastic liver lesions in a medium-term liver bioassay in F344 rats: relation to the influence of electromagnetic near field exposure. *Cancer Lett*; 155:105–114.
- Jeong, W. S., Jun, M., Kong, A. N. (2006) Nrf2: A potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds, *Antioxid. RedoxSignal.* 8, 99–106.
- Karbownik, M., Garcia, J., Lewinski, A., Reiter, R. J. (2001) Carcinogen induced, free radical-mediated reduction in microsomal membrane fluidity: reversal by indole-3-propionic acid. *J. Bioenerg. Biomembr*, 33 73–78.
- Klaunig, J., Kamendulis, L., Hocevar, B. (2010) Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis *Toxicologic Pathology*, 38: 96-109.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

- Lissoni, P., Rovelli, F., Malugani, F. et al., (2001) Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol Lett*; 22:45–47.
- Lissoni, P., Rovelli, F., Meregalli, S. et al., (1997) Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J Biol Regul Homeost Agents*; 11:157–159.
- Liu, R., Fu, A., Hoffman, A. E., Zheng, T. and Zhu, Y. (2013) Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways, *BMC Cell Biology*, 14:1.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265–275.
- Malik, S., Bhatnagar, S., Chaudhary, N., Katare, D. P. and Jain, S. K. (2013) DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. *Protoplasma*, 250, 175-83.
- Masotti, L., Casali, E. and Galeotti, T. (1988) Lipid peroxidation in tumour cells. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 4, pp. 377-386.
- Mauriz, J. L., Matilla, B., Culebras, J. M., González, P. and González-Gallego, J. (2001) Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radic Biol Med*, 31, 1236-44.
- Mauriz, J. L., Molpeceres, V., García-Mediavilla, M. V., González, P., Barrio, J. P. and González-Gallego, J. (2007) Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res*, 42, 222-30.
- Mills, E., Wu, P., Seely, D. and Guyatt, G. (2005) Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis *J. Pineal Res.* 39:360–366.
- Misra, H. P. and Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247, 3170-5.
- Molpeceres, V., Mauriz, J., Garcia-Mediavilla, M., Gonzalez, P., Barrio, J. and Gonzalez-Gallego, J. (2007) Melatonin Is Able to Reduce the Apoptotic Liver Changes Induced by Aging Via Inhibition of the Intrinsic Pathway of Apoptosis *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, Vol. 62A, No. 7, 687–695.
- Moreira, A., Rodrigues, G., Bona, S., Cerski, T., Marroni, C., Muriz, J., Gonzalez Gallego, J, Marroni, N. (2015) Oxidative Stress and Cell Damage in a Model of Precancerous Lesions and Advanced Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Toxicology Reports* 2: 333-340.

- Paradis, V. (2013) Histopathology of Hepatocellular Carcinoma. Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma, Recent Results in *Cancer Research*, 190, DOI: 10.1007/978-3-642-16037-02.
- Poirier L. (2002) The Effects of Diet, Genetics and Chemicals on Toxicity and Aberrant DNA Methylation: an Introduction, *J. Nutr*, 132: 2336S–2339S.
- Rasmussen, D. D., Boldt, B. M., Wilkinson, C. W., Yellon, S. M., Matsumoto, A. M. (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140:1009–1012.
- Reiter, R. J. (2004) Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res*, 37:213–214.
- Reiter, R. J., Tan, D. X. (2002) Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann NY Acad Sci*, 957: 341–344.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Qi, W. (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence, *Cell Biochem. Biophys.* 34 237–256.
- Reiter, R., Tan, D., Terron, P., Flores, L., Czarnocki, Z. (2007) Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions *Acta Bioch Polonica*, 54, (1) 1-9.
- San Miguel, B., Crespo, I., Alvarez, M., Jorquera, F., Tuñón, M. J. and González-Gallego, J. (2013) Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 50, 38-45.
- Sánchez-Pérez, Y., Carrasco-Legleu, C., García-Cuellar, C., Pérez-Carreón, J., Hernández-García, S., Salcido-Neyoy, M., Alemán-Lazarini, L., Villa-Treviño, S. (2005) Oxidative stress in carcinogenesis: Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis, *Cancer Letters* 217, 25-32.
- Siegel, D., Yan, C., Ross, D. (2012) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones, *Biochemical Pharmacology*, 83 1033–1040.
- Souza, A., Meurer, L., Silveira, T. R., Gregorio, C., Reus, N., Uribe, C., Matte, U. and Santos, J. L. (2014) Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatric Research*, 75 1: 22-28.

- Speclor, A. A. and Burns, C. P. (1987) Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res*, 47:4529-4537.
- Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Cardinali, D. P. (2008) Therapeutic Actions of Melatonin in Cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther*, 7: 189-203.
- Strasak, A. M., Rapp, K., Brant, L. J., Hilbe, W., Gregory, M., Oberaigner, W., Ruttman, E., Concin, H., Diem, G., Pfeiffer, K. P., Ulmer, H. (2008) Association of gamma-glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study. *Cancer Res*, 68, (10) 3970-7.
- Subramanian, P., Mirunalini, S., Dakshavani, K. B., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Cardinali, D. P. (2007) Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. *J. Pineal Res* 43:305–312.
- Tappel, A. L. (1980) Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation. In: Pryor, W. A., ed. *Free radicals in biology*, Vol. IV. New York: Academic Press; 1-47.
- Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M., Brix, A., Singh, B., Belpoggi, F. and Ward, J. M. (2010) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system, *Toxicol Pathol*, 38: 5S-81S.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y. et al., (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-21.
- Tomas-Zapico, C., Coto-Montes, A. (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*, 39:99–104.
- Van Eyken, P. L., Sciote, R., Paterson, A., Callea, F., Kew, M. C., Desmet, V. J. (1988) Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 19; 562–568.
- Verna, L., Whysner, J., Williams, G. M. (1996) N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation *Pharmacol Ther*, 71:57-81.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., Wang, C. X., Ali, N., Rivenson, A., Peterson, L. A., Schulz, C. and Gebhardt, R. (1996) Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA damage, centrilobular cytotoxicity, cell proliferation and carcinogenesis in rat liver exhibit some non-linearities. *Carcinogenesis*, 17, 2253-8.

Wolfson, N., Wilbur, K. M., Bernheim, E. (1956) Lipid peroxide formation in regenerating rat liver. *Exp. Cell Res*,10:556-558.

Zhang, Q., Ma, Z., Xin, Q., Liu, G. Q., Liu, B. B., Gao, Y. T., Zhang, C. S., Du, Z. (2013) Diagnostic value of absent ductular reaction at hepatocellular-stromal boundaries in early stage hepatocellular carcinoma *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. Dec; 21(12):924-8.

Figure legends

Figure 1: Effects of melatonin on serum levels AST, ALT, AP, γ GT activities in DEN-induced hepatocarcinogenesis. (a): $p < 0.05$ vs control, DEN+MEL5W, DEN+MEL12W groups; (b): $p < 0.05$ vs Control and DEN-HCC groups. (One-way ANOVA and Tukey's test)

Figure 2a: Photomicrographs of liver sections. (A) Control: normal hepatic parenchyma. (B) DEN-HCC: Advanced HCC. Note tumor (T) and hepatic parenchyma (HP). (C) DEN+MEL5W: precancerous lesions with low-grade dysplastic nodules (DN). (D) DEN+MEL12W: cirrhosis with low-grade dysplastic nodules (DN). (Tissue samples counter stained with hematoxylin-eosin; original magnification 40x). Figure 2b: Photomicrographs of liver sections. (E) Control: low positivity of cytokeratin 7 protein. (F) DEN-HCC: high positivity of cytokeratin 7 protein. Extensive ductular reaction. (G) DEN+MEL5W: low positivity of cytokeratin 7 protein. (H) DEN+MEL12W: low positivity of cytokeratin 7 protein (Original magnification 200x). Note: CK7: Cytokeratin 7 by immunohistochemistry (pCK7 in %).

Figure 3: Effects of melatonin on LPO levels, protein carbonyl levels, damage index of liver DNA and SOD activity in DEN-induced hepatocarcinogenesis. (A) TBARS method. (B) Protein Carbonyl. (C) SOD activity. (D) Comet assay: damage index (DI) - can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (maximum damage 100 x 4). (7 animals per group). Significant difference: (a) $p < 0.05$ vs control group; (b) $p < 0.05$ vs DEN-HCC group. (One-way ANOVA and Tukey's test).

Figure 4: Western blot analysis of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, Keap1, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase

1, p65 and nuclear factor erythroid 2-related factor 2. Protein from liver extracts was separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. **A)** DEN+MEL5W group: representative images and densitometric quantification. **B)** DEN+MEL12W group: representative images and densitometric quantification. Arbitrary values expressed as means \pm standard deviation (n=7). (a) $p < 0.05$ vs Control and DEN+MEL groups. (b) $p < 0.05$ vs Control and DEN. Tukey's test. Note: eNOS: endothelial nitric oxide synthase; iNOS: inducible nitric oxide synthase; Keap1: *Kelch-like ECH associated protein 1*; p65: NFkB/REL A; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NQO1: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Legend of Supplementary material (a): Schematic model of the action of reactive oxygen species on the lipids, proteins and DNA under conditions of hepatocarcinogenesis in the absence of melatonin. Inflammation, vascular dysfunction, increased DNA damage and lower LPO due to substrate loss can be seen. **(b):** Schematic model of the action of reactive oxygen species on the lipids, proteins and DNA under conditions of hepatocarcinogenesis in the presence of melatonin. Melatonin reduces inflammation and enhances the action of the antioxidant system, protects DNA and maintains the lipid components.

Table 1: Effects of Melatonin on weight and HSR in DEN-induced hepatocarcinogenesis.

Group	CO (I)	DEN-HCC (II)	DEN+MEL5W (III)	DEN+MEL12W (IV)
Initial Weight (g)	153 \pm 9	150 \pm 8	154 \pm 12	155 \pm 9
Final Weight (g)	480.4 \pm 29	319.1 \pm 36 ^a	330 \pm 50 ^a	335 \pm 25 ^a
HSR (%)	3 \pm 0.16	12.8 \pm 5 ^b	4.7 \pm 1	4.1 \pm 0.6

Values are mean \pm SD for 8-10 rats. HSR: hepatosomatic rate. Co: control; DEN: diethylnitrosamine; HCC: hepatocellular carcinoma; MEL: melatonin Tukey's test. (a) $p < 0.05$ against CO group. (b) $p < 0.05$ II group against I, III and IV groups.

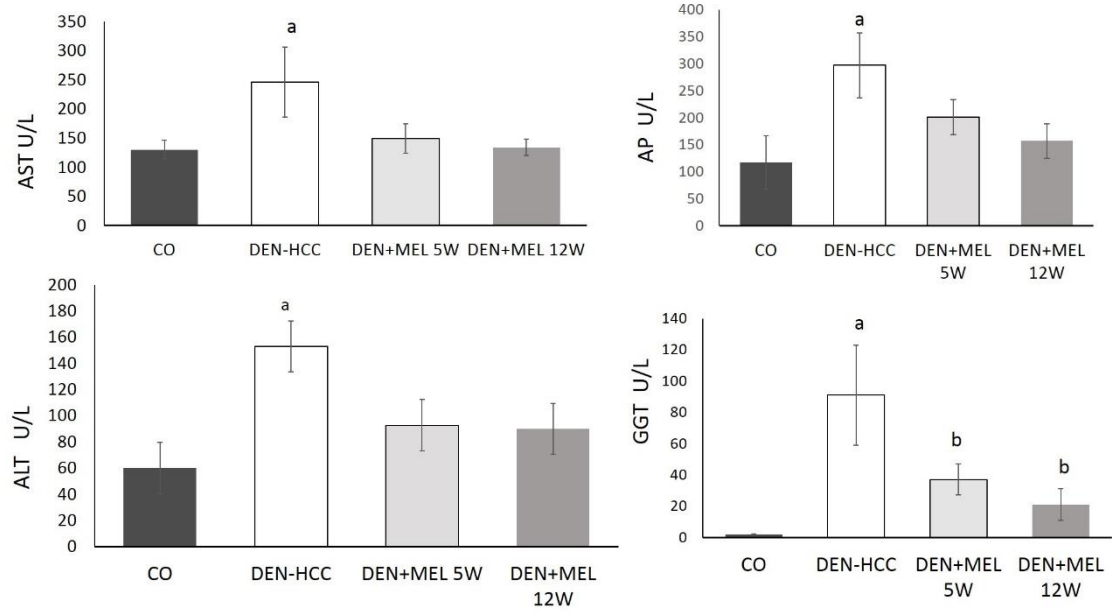


Figure 1

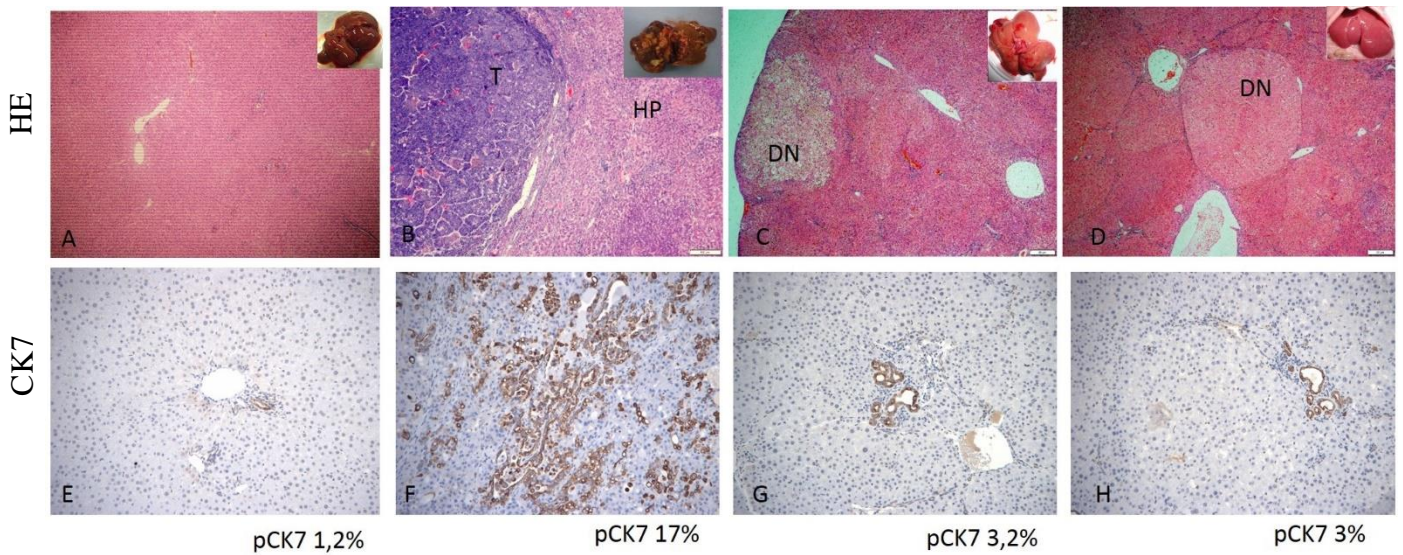


Figure 2a and 2b

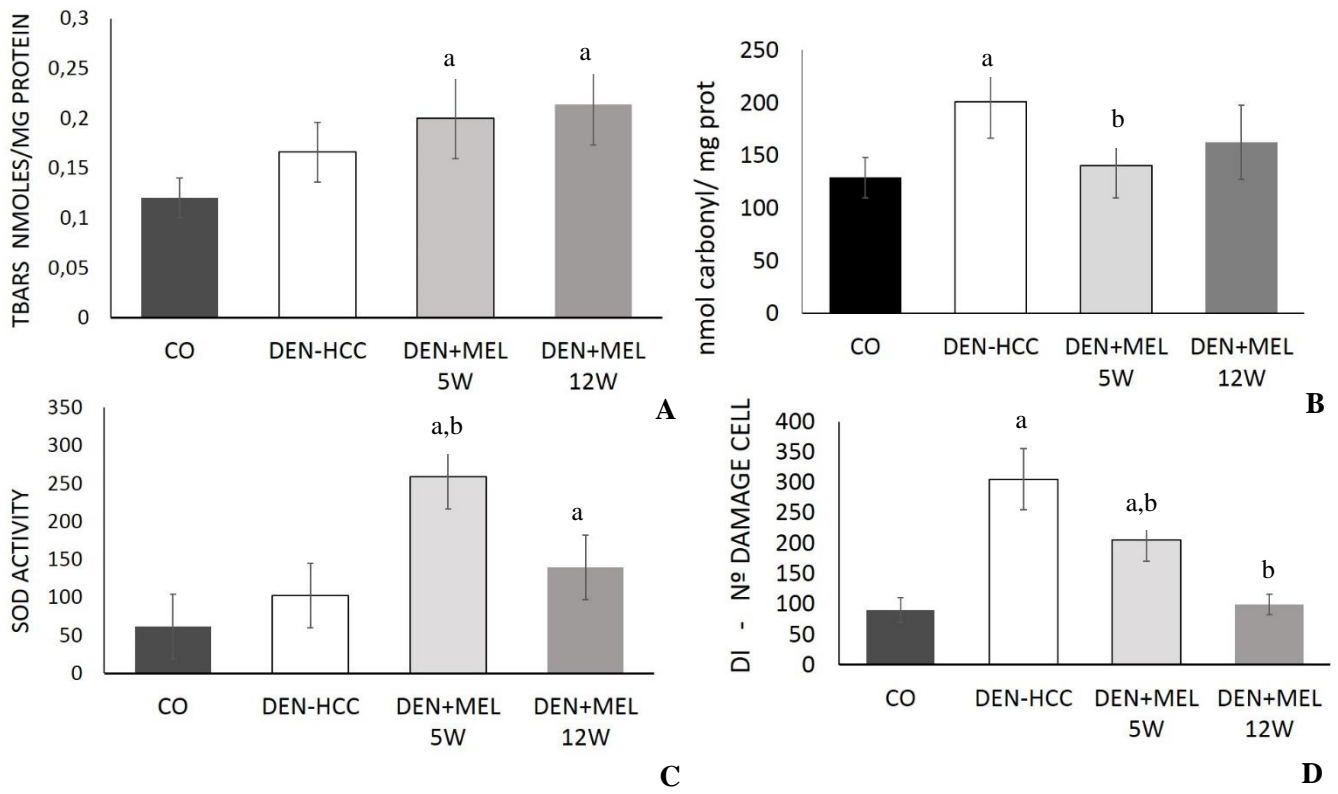


Figure 3 A,B,C e D

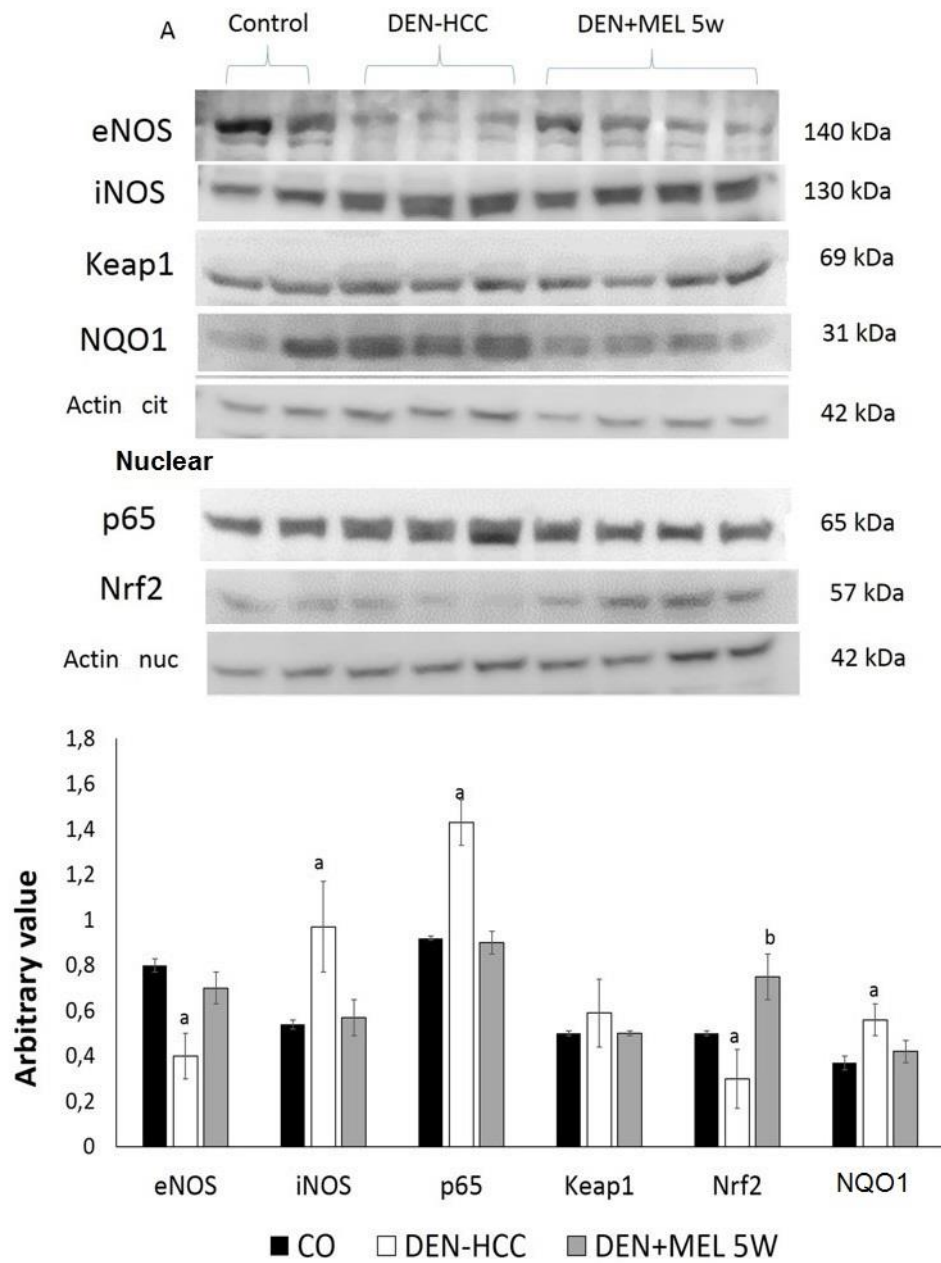


Figure 4 A

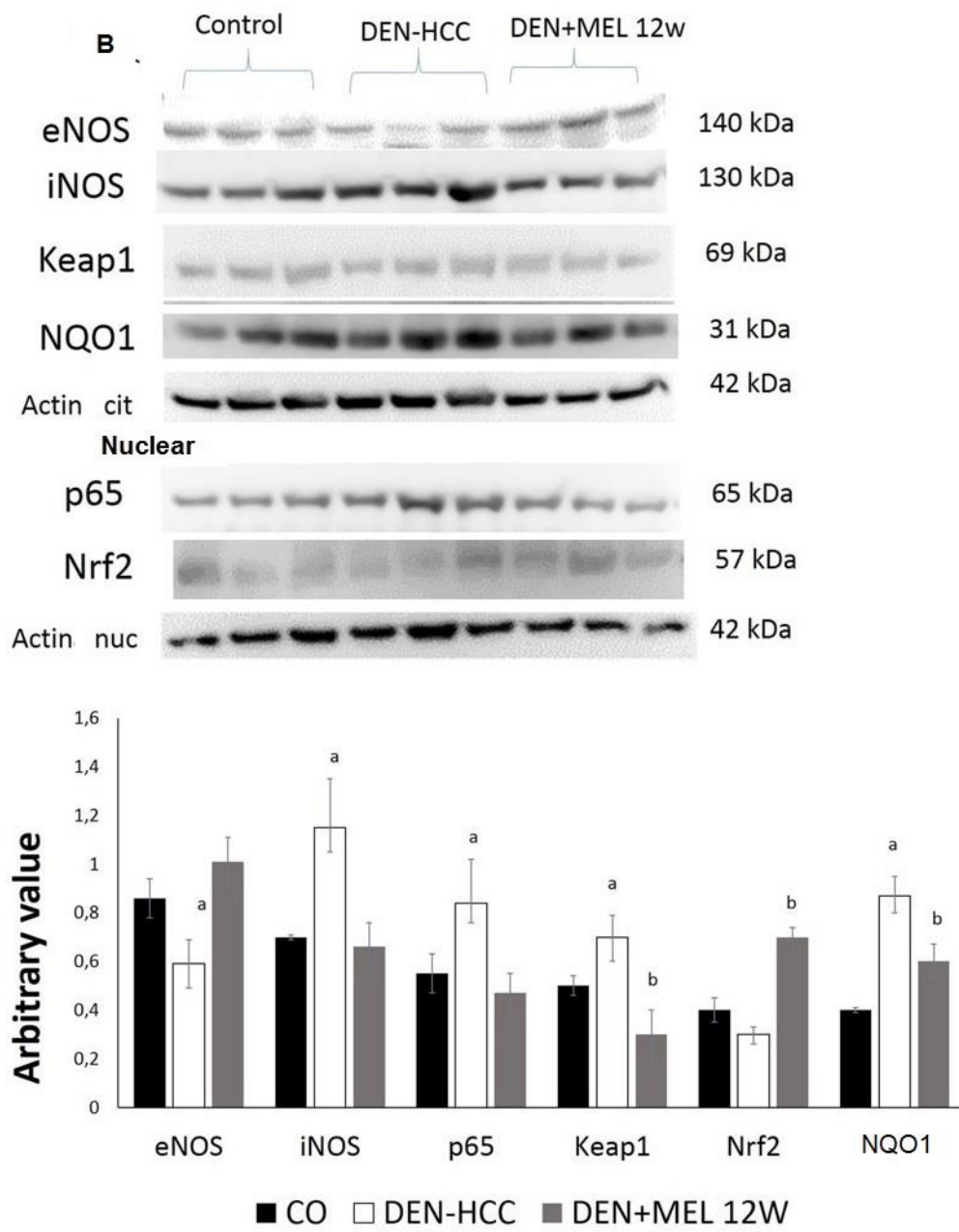
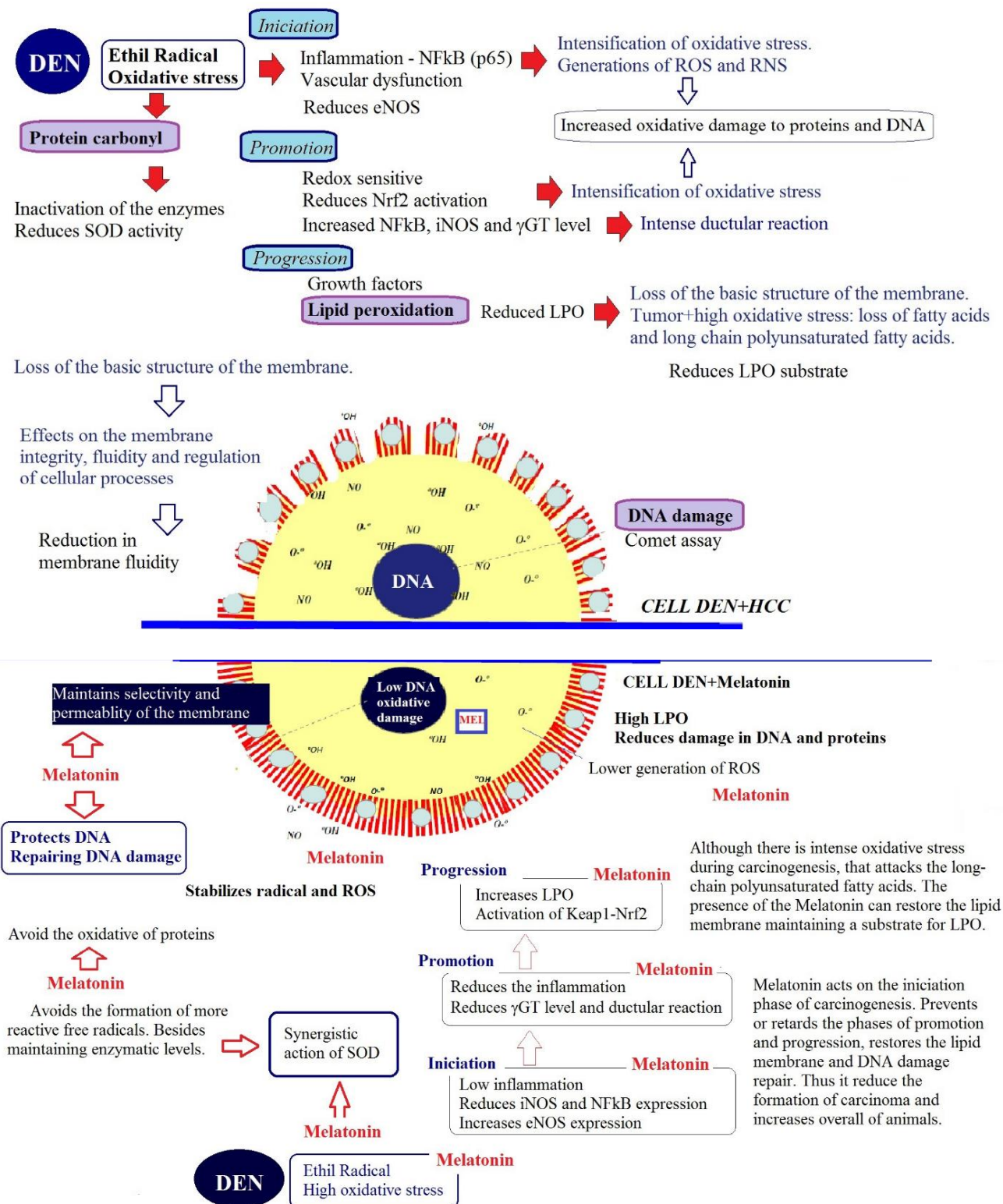


Figure B



2 *Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis, foi aceito na PlosOne, 2015.*

Este artigo responde os seguintes objetivos específicos do Experimento II:

Avaliar a relação hepatossomática dos animais submetidos à carcinogênese com e sem Melatonina.

Avaliar as enzimas de integridade hepática mediante a quantificação de AST, ALT, FA e γ GT dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

Avaliar os aspectos macroscópicos do fígado dos animais submetidos à carcinogênese com ou sem Melatonina;

Avaliar aspectos histológicos do fígado pela coloração HE dos fígados dos animais submetidos à carcinogênese e tratados com ou sem Melatonina;

Determinar a expressão do marcador tumoral GST-P do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina

Determinar expressão de COX-2 do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;

Comprovar o efeito da Melatonina sobre o estresse de retículo e a apoptose na carcinogênese hepática mediante a análise por Western blot da expressão de proteínas envolvidas com estresse de retículo (ATF6, BiP e CHOP/GADD) e de proteínas proapoptóticas (Fas, Bax, TRAIL) e anti-apoptóticas (Bcl2, Bclx/L), p53, caspases 8, 9 e 3.



Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-induced Hepatocarcinogenesis

Andrea Janz Moreira^{1,2}, Raquel Ordoñez⁴, Carlos Thadeu Cerski^{1,2}, Jaqueline Nascimento Picada³, Norma Possa Marroni^{1,2,3}, Jose L. Mauriz⁴, and Javier González-Gallego^{4*}

¹ Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Graduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brazil.

⁴ Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), León, Spain

*Corresponding author: e-mail: jgonga@unileon.es

Running head: Melatonin in DEN-induced hepatocarcinoma

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal human cancers worldwide because of its high incidence, its metastatic potential and the low efficacy of conventional treatment. Inactivation of apoptosis is implicated in tumour progression and chemotherapy resistance, and has been linked to the presence of endoplasmic reticulum stress. Melatonin, the main product of the pineal gland, exerts anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-angiogenic effects in HCC cells, but these effects still need to be confirmed in animal models. Male Wistar rats in treatment groups received diethylnitrosamine (DEN) 50 mg/kg intraperitoneally twice/once a week for 18 weeks. Melatonin was given in drinking water at 1 mg/kg/d, beginning 5 or 12 weeks after the start of DEN administration. Melatonin improved survival rates and successfully attenuated liver injury, as shown by histopathology, decreased levels of serum transaminases and reduced expression of placental glutathione S-transferase. Furthermore, melatonin treatment resulted in a significant increase of caspase 3, 8 and 9 activities, polyadenosine diphosphate (ADP) ribose polymerase (PARP) cleavage, and Bcl-associated X protein (Bax)/Bcl-2 ratio. Cytochrome c, p53 and Fas-L protein concentration were also significantly enhanced by melatonin. Melatonin induced an increased expression of activating transcription factor 6 (ATF6), C/EBP-homologous protein (CHOP) and immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP), while cyclooxygenase (COX)-2 expression decreased. Data obtained suggest that induction of apoptosis and ER stress contribute to the beneficial effects of melatonin in rats with DEN-induced HCC.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common disease in men worldwide, the seventh in women and the third leading cause of cancer-related mortality. It has been established as the final step for chronic liver diseases, and it is closely related to fibrosis and cirrhosis with a variable aetiology [1]. Its incidence and mortality are higher in developing regions, but most of the burden occurs in developed countries [2]. In developed countries (North America, Europe and Japan) infection with hepatitis C virus (HCV) and alcohol use are the main risk factors. However, in underdeveloped countries HCC is associated with hepatitis B (HBV) and exposure to aflatoxin B1 [3]. The late diagnosis and the low efficacy of drugs employed in its treatment make HCC the third cause of cancer death. Moreover, it is well known that HCC develops resistance to chemotherapeutic agents, which complicates HCC management [1].

Resistance to cell death is a distinctive characteristic of cancer. Apoptosis is one of the main mechanisms implicated in cell death, and its inactivation contributes to tumour progression and chemotherapy resistance [4]. Apoptosis can be triggered by different pathways that depend on the initial stimulus. The extrinsic pathway requires the activation of transmembrane receptors by soluble death ligands, such as Fas ligand (Fas-L), that initiate a cascade of events which finally stimulate caspase 3 pro-death activity [5]. The intrinsic pathway involves the mitochondrial release of cytochrome c, allowing apoptosome complex formation and consequently procaspases activation. The permeabilization of mitochondrial membrane is necessary for the translocation of cytochrome c to cytosol, and this process is regulated by the Bcl-2 family of proteins [6]. The cascade of apoptosis signal transduction begins by the action of initiator caspases that are recruited and activated by autocatalytic processing. Among these caspases, caspase 8 and 9 are the main initiators of programmed cell death; caspase 8 is stimulated

in response to extrinsic death ligands, while caspase 9 is necessary for the activation of executor caspase 3 [7]. Targeting both the intrinsic and extrinsic pathways reduces the growth of different tumour types, and a large number of studies demonstrate that different drugs alone or in combination enhance apoptosis in cancerous cells, including HCC [8].

Various cell stress factors lead to the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER), causing an imbalance that activates the unfolded protein response (UPR) in an attempt to ameliorate the protein accumulation in ER. Different pathways which are initiated by sensor proteins located in the membrane of the ER have been found as mediators of the ER stress response. Under non-extreme conditions, these proteins are inactivated due to the immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) to their luminal domains; however, when unfolded proteins are accumulated, BiP is sequestered, letting ER stress sensors to initiate the protective response. Even so, if damage is not improved, ER stress turns out lethal. ER stress is also deregulated in different pathologies, including cancer [9]. Due to the tumour microenvironment, ER stress is activated as an adaptive mechanism in certain types of cancer, such as breast, prostate or liver cancers [10,11]. However, apoptosis derived from non-resolved ER stress has also been observed, indicating that a sustained ER stress response could contribute to tumour cell death [12]. C/EBP homologous protein (CHOP) has been indicated as a crucial element for ER stress-induced apoptosis [13]. Management of ER stress could have anticancer properties in HCC cell lines, in which it has been reported that ER stress induction via PERK phosphorylation leads to an increase in cell death through CHOP activity [14].

Melatonin is an indole hormone that regulates important physiological processes in eukaryotic and prokaryotic organisms. Beneficial effects on a wide range of pathological situations strengthened its possible antitumor effect, and many studies have demonstrated

that melatonin is able to prevent promotion and progression in different cancers [15]. Melatonin combined with immunomodulating therapy in patients with HCC that are not suitable for conventional therapy delays tumour progression and reverses tumour formation [16]. Proapoptotic effects of melatonin [17-21], and effects in combination with ER stress inducers [22,23] have been reported in different HCC cell lines. Interestingly, melatonin has been shown to induce apoptosis under ER stress situations in hepatoma cells via induction of CHOP and suppression of cyclooxygenase 2 (COX-2) [22]. However, in spite of the number of *in vitro* studies on the beneficial effects of melatonin, only results demonstrating effects on cancer development and oxidative stress are available in animal models of HCC [24-26], and underlying mechanisms of melatonin effects are not completely understood. This research was aimed to extend our previous *in vitro* findings, which demonstrate cell cycle arrest and apoptosis induction in HepG2 cells through intrinsic and extrinsic pathway [17-20]. Given the relationship between apoptosis and ER stress, we decided to investigate the possible modulation of both processes by melatonin in an *in vivo* diethylnitrosamine (DEN)-induced rat model of HCC.

Material and Methods

Animals and experimental design

Male Wistar rats weighing 140-150 g were used for this study and were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas, Brazil. The rats were caged individually at 24°C, with a 12h light-dark cycle and free access to food and water until the time of experiments in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. All experiments were performed in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS) under protocol number

140311 and were approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Brazil).

To induce hepatocarcinogenesis animals were given DEN (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) at a dose of 50 mg/kg body weight i.p. twice a week for the first three weeks and once a week from weeks 4 to 6 and 11 to 13 up to 19 weeks. A single dose of 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 100 mg/kg, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was administered in week 4 [27]. The animals were divided into five groups: Control (CO); Control+melatonin (CO+MEL); DEN; DEN+melatonin from the 5th to the 19th week (DEN+MEL5) and (V) DEN+melatonin from the 12th to the 19th week (DEN+MEL12). Melatonin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) was prepared three times a week by dissolving the drug (16 mg) in ethanol 250 μ L, 100%, vol/vol) [28]. This solution was then diluted with drinking water to a final concentration of 20 mg/L. Melatonin was administered daily for 90 days (group DEN+MEL5) and 45 days (group DEN+MEL12). Water bottles were covered with aluminium foil. Rats drank about 25 mL/day, and the average daily intake of melatonin was estimated to be 1 mg/kg/day, which was expected to rise 20–30 times normal plasma melatonin levels. Appropriate dilutions were made to the drinking melatonin solution to match individual variations in water consumption on the previous day [28].

After fasting for 12 hours, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketalar® 100 mg/kg) and xylazine (50 mg/kg) and subjected to blood collection for measurement of biochemical analysis. Liver samples were removed for histological analysis and comet assay. Samples of livers for histology, biochemical and molecular analyses were taken from the right medial lobe. The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, as described in the American Veterinary Medical Association (AVMA, 2013) Guidelines on Euthanasia.

Biochemical analysis

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline phosphatase (AP) were measured with automated routine laboratory methods at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Histology

For histological examination, a specimen of liver was trimmed and fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours. The blocks were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin wax. Serial 3- μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and imaged (200x magnification).

Immunohistochemical staining

Immunohistochemistry was used for detection of caspase 3 positive cells in liver samples. Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of 4- μ m were dewax and hydrated through a gradient of ethanol. Antigen retrieval was performed in 10 mM citrate, pH 6.0, by heating in a microwave oven for 25 minutes at 720 W. After cool down (30 minutes at room temperature), endogenous peroxidase was blocked by exposure to 3% hydrogen peroxide in methanol for 15 minutes. The slides were incubated with antibody cleaved-caspase 3 (1:50 dilution, Cell Signaling, MA) overnight at 4°C. After washing with PBS, slides were incubated with secondary Dako EnVision+System-HRP labelled polymer anti-rabbit (Dako North America, CA) and bound antibody was visualized by use of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Cell nuclei were counterstained with hematoxylin. The specificity of the technique was evaluated by negative controls.

Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al [29] with minor modifications. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analysed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal and consequently for each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 cells x 4) and damage frequency (DF) was calculated based on the number of cell with tail versus those with no tail.

Caspase-3, 8 and 9 activities assays

Enzymatic activities were performed in total extracts prepared by liver tissue homogenization in 0.25 M sucrose, 10 mM Tris, 1mM EDTA and a phosphatase and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Protein concentration was determined by Bradford assay. Equal amounts of protein were incubated for 60 min at 37°C in a buffer 20 mM HEPES, glycerol 10%, DTT 2 mM, pH=7.4 containing 100 µM concentration of the specific fluorogenic Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AFC and Ac-LEHD-AMC for caspase-3, -8 and -9 respectively (Alexis Biochemicals, Cornerstone, San Diego, CA, USA). Cleavage of fluorescent substrates was monitored using fluorescence microtitre plate reader (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) at excitation/emission wavelengths of 360/460 nm for caspase-3 and -9, and 400/505 nm for caspase-8. Activity was expressed as fluorescents units per min of incubation.

Western blot analysis

Western blot analyses were performed on cytosolic extracts prepared by liver tissue homogenization in 0.25 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris and a phosphatase and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic GmbH). The homogenate was incubated on

ice for 30 min, and finally, the samples were centrifuged at 12,000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant fraction was recollected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration was measured by the Bradford assay. Equal amounts of protein (15–30 µg) were separated by 9–12% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis for 1.5 hr at 100 V and then blotted on polyvinylidene fluoride membranes (Amersham Pharmacia; Little Chalfont, UK). The membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk in phosphate buffered saline buffer containing 0.05% Tween 20 (PBST) for 1 hr at room temperature and probed overnight at 4°C with polyclonal anti-PARP cleaved, Bcl-2, Bax, Fas-L, p53, COX-2, BiP, CHOP and ATF6 antibodies (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) and GST-P polyclonal antibody (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA) at 1:200-1:1,000 dilution with PBS-T containing 2.5% non-fat dry milk. Equal loading of protein was demonstrated by probing the membranes with a rabbit anti-β-actin polyclonal antibody (1:2,000 Sigma; St Louis, MO). After washing with TBST, the membranes were incubated for 1 hr at room temperature with secondary HRP conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1:4,000) and visualized using ECL detection kit (Amersham Pharmacia; Uppsala, Sweden) [30]. The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer (Scion Image; Maryland, MA).

Statistical analyses

Results were expressed as mean values. Significant differences between means were evaluated by one-way analysis of variance; in the case of significance, the means were compared with the Bonferroni test. Significance was accepted when *P* value was less than 0.05. Values were analyzed using the statistical package SPSS 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY).

Results

Serum biochemical analyses were performed to determine hepatic function. Both ALT and AST activities showed a significant increase in DEN-treated group which was significantly prevented by melatonin. AP and GGT also exhibited an increase in DEN group, that was partially inhibited by melatonin. The hepatic-somatic ratio was significantly higher in DEN animals than in melatonin-co administered groups (Table 1).

Microscopy observations revealed that DEN induced chronic damage and lymphocytic infiltration. Livers of DEN-treated rats presented areas characterized by large nucleolus and increased mitotic index, and hepatic parenchyma was altered, with pseudotrabeular and pseudoacinar growth pattern showing large HCC nodules. Treatment with melatonin resulted in a significant amelioration in histologic changes; DEN+MEL5 showed only some dysplastic foci, and DEN+MEL12 samples showed multiple nodules of regeneration, precancerous lesions with fibrosis and cirrhotic pattern (Fig. 1B).

Placental GST-P is expressed during hepatocarcinogenesis in rats, and is used as a HCC marker. GST-P protein levels were analyzed by Western blot, showing an increase in DEN group. However, in melatonin plus DEN-treated animals, its expression was significantly lower (Fig. 1C), reaching a higher extent in the late-stage treated group. The study of DNA integrity was assessed by comet assay in blood and liver. No significant alterations were observed in blood, but there was a significant increase in damage index in DEN group compared to control in hepatic tissue. Moreover, melatonin supplementation reduced DNA damage and damage frequency compared to DEN group (Table 2).

To elucidate the possible proapoptotic effect of melatonin, we performed several analyses on the apoptotic pathway. The status of PARP and caspase-3 was evaluated as final markers of apoptosis. We observed that cleaved PARP expression decreased in

DEN-treated animals and was significantly augmented by melatonin, showing a restoration of normal levels (Fig. 2C). Caspase 3 activity was measured by incubating samples with a specific fluoregenic substrate. An increase in fluorescence was observed when melatonin was supplemented in DEN-treated animals (Fig. 2A). Moreover, active caspase 3 positive foci were observed by immunohistochemistry in livers of DEN plus melatonin groups compared to control animals (Fig. 2B). Activation of the executor caspase 3 indicates that melatonin is able to induce apoptosis, suggesting that death of cancer liver cells could contribute to the improvement in liver histology.

To clarify the mechanism of apoptosis induced by melatonin, markers of the intrinsic apoptotic pathway were analyzed by Western blot. Caspase 9 activity showed an increase in melatonin groups compared to control and DEN animals. The balance between apoptotic and anti-apoptotic proteins was assessed by the Bax/bcl-2 ratio. Although DEN was not able to alter this relation, melatonin administration increased the Bax/bcl-2 ratio (Fig. 3). Moreover, mitochondrial dysfunction was evaluated by measuring cytochrome c protein levels in cytosolic liver fractions; cytochrome c expression decreased significantly in DEN group and was significantly increased in melatonin-supplemented animals (Fig. 3). p53 expression was also significantly reduced in DEN rats and increased in those receiving melatonin (Fig. 3). All these data suggest that melatonin is able to increase intrinsic apoptosis in HCC. Because apoptosis can also be managed by an extrinsic pathway, we evaluated the expression of Fas-L, and caspase 8 activity. As shown in figure 4, both caspase 8 activity and Fas-L protein levels were not altered by DEN, but augmented when melatonin was administered to DEN-treated animals. These observations suggest that not only intrinsic but also extrinsic apoptosis is induced by melatonin in HCC.

ER stress is one of the mechanisms altered during hepatocarcinogenesis and is closely related to apoptosis, so we decided to evaluate the status of ER markers. Melatonin addition induced CHOP and BiP expression in both melatonin-treated groups, (Fig. 5). ATF6 is one of the sensor proteins which, after cleavage, activate the expression of CHOP and BiP. ATF6 proteolysis was analysed by Western blot, showing that melatonin was able to increase the levels of the active form ATF6 p50 compared to DEN and control groups (Fig. 5). This induction was larger in the group of rats that received melatonin at an advanced stage. These observations indicate that the indole is able to induce ER stress in liver animals with HCC. COX-2 has been shown to regulate both, apoptosis and ER stress. To define the possible implication of COX-2 in the effects of melatonin action, we analyzed COX-2 protein levels, and observed that DEN increased the expression of this protein, but melatonin supplementation reduced significantly its levels (Fig. 5), suggesting a possible role of COX-2 in the apoptotic and ER alteration effects of melatonin in HCC.

Discussion

Among the different *in vivo* models that have been developed to induce HCC, the DEN model has been widely used. The carcinogenic activity of DEN is triggered by DNA damage and reactive oxygen species formation [31]. Here, we have used a previously validated model of exposure to DEN [27] to address the effects of melatonin on HCC. Melatonin is known to present oncostatic properties by enhancing antioxidant systems and immune mechanisms, and modulating pathways that control cell cycle and cell growth [32-34]. However, mechanisms contributing to the beneficial effects of melatonin in HCC *in vivo* are not fully understood, so we decided to focus on the role of melatonin in the regulation of different molecular pathways related to cell death in HCC.

Histology revealed that DEN treatment caused the formation of nodules and alterations in hepatic tissue, in parallel to an increased hepatic-somatic ratio. Damaging effect of DEN was corroborated by induction of DNA fragmentation and increased serum levels of liver enzymes. In addition, induction of HCC was assessed by analysing GST-P protein levels in liver tissue homogenates. GST-P has been used as HCC marker whose expression is repressed in normal livers [35]. Western blot showed that DEN increased significantly the levels of GST-P. All these findings are in accordance with results by other groups that also used DEN as a HCC promoter in rats [24,36,37] and mice [38]. Administration of melatonin to DEN-treated animals indicated that the indole was able to reduce hepatocarcinogenic features in HCC-bearing rats, because it caused an ameliorated histology, and reduced changes in serum enzymes and GST-P expression. Melatonin also prevented DNA damage in DEN treated animal, which is in accordance with a report that melatonin is able to regulate several key genes involved in DNA repairing pathways, such as CEP152 and N4BP2L2, in breast cancer cells [39]. Our results are also in agreement with a previous study which shows how melatonin counteracts deleterious effects on liver histology and function in rats injected with DEN [24]. Different antioxidants, including resveratrol, maotai or saffron, have been tested in DEN-induced HCC model, showing a reversion in the carcinogenic effects of the toxic [37,38,40,41]. However, other natural compounds with hepatoprotective properties such as silymarin have not demonstrated an anticarcinogenic effect in this model of hepatocarcinogenesis [36], although it has been found that silimaryn is able to inhibit tumour growth *in vitro* [42]. Experimental designs, doses utilized and time of the experiments could contribute to explain different effects of these compounds in animal and *in vitro* models.

Anti-oncogenic properties of melatonin have been tested in different cancer types, including breast, melanoma, neuroblastoma or prostate cancer [15]. Most studies concerning HCC have been carried out in cultured hepatoma cells, where melatonin modulates apoptosis, inhibits the expression of angiogenic genes and reduces the migration and motility of HepG2 cells during metastasis, with no toxic effects on healthy hepatocytes [17-21]. Melatonin has been reported to restore antioxidant machinery and liver biochemical parameters [24], and to reduce neoplastic lesions and GST-P expression in DEN-treated rats [26]. However, the effects of melatonin and other natural compounds in the DEN model are mainly focused on their impact on antioxidant machinery but not in the molecular mechanisms that have been observed *in vitro*, so it is necessary to confirm the observations made in culture cells to define effective targets for HCC treatment [43-45].

Because apoptosis disturbances are key events in cancer we decided to evaluate the effect of melatonin on the apoptotic status in DEN-treated rats. Caspase 3 is the main executor of apoptosis and its activation results in PARP proteolysis [46]. Our data indicate that melatonin increased PARP cleavage and caspase 3 activity, confirming its proapoptotic effect. These results are in agreement with our previous findings in HepG2 cells, where supraphysiological doses of melatonin induced an activation of apoptosis and cell death [17]. Combination of melatonin with chemotherapeutics such as doxorubicin or sorafenib [47,48] also increase apoptosis in hepatoma cells. In addition, other antioxidants have also demonstrated pro-apoptotic properties in HCC induced by DEN injection. Curcumin enhances cytochrome c release and DNA fragmentation compared to DEN control group [49]. Saffron, resveratrol and morin induce caspase 3 activation and PARP fragmentation [37,40,50], indicating that beneficial effects of these natural compounds in HCC are possible linked to apoptosis induction.

To clarify the proapoptotic mechanism of melatonin, and based on our previous studies *in vitro*, we decided to evaluate the status of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. Intrinsic pathway is frequently aberrant in cancer, and Bcl-2 protein family members are expressed abnormally in cancer cell lines and tumour human samples [51]. We observed that Bax protein levels increased in animals with HCC that received melatonin. It is known that Bax is inactivated in solid tumours [52], so restoration of its functionality could lead to HCC regression. Bcl-2, the main anti-apoptotic protein is able to inhibit Bax action, and it has become an important target for the development of new drugs [53,54], so the relationship between both proteins was analyzed. The Bax/bcl-2 ratio was higher in melatonin supplemented groups compared to DEN-treated animals. This effect correlated with the release of cytochrome c from the mitochondria, indicating that regulation of the mitochondrial pathway contributes to melatonin effects. In HepG2 cells, melatonin is able to increase Bax expression and the cytosolic release of cytochrome c [17]. Other antioxidants, such as resveratrol and morin have also been reported to increase Bax protein levels [37,50]. p53 acts as a transcription factor that regulates the expression of genes involved in apoptosis, such as Bax or bcl-2 [55]. Here, we have found that melatonin plus DEN-treated rats overexpressed p53 in hepatic tissue, suggesting that this protein could be involved in the regulation of intrinsic apoptotic markers by melatonin. Due to the fact that melatonin also activates the extrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells [17], we evaluated the activity of caspase 8, a key initiator caspase that mediates the death receptor pathway of apoptosis, in which the binding of Fas to Fas-L induces receptor clustering and formation of death-induced signalling complexes. Caspase 8 activity and Fas-L expression were induced in HCC-bearing rats treated with melatonin, indicating a possible implication of the extrinsic pathway in the pro-apoptotic effects of the indole. Melatonin has also been reported to induce caspase 8 activation in H₂O₂-

treated leukaemia HL-60 cells, but had no effect in leukemia Molt-3 cells [56,57], indicating that effects of melatonin are cell type and context-dependent.

ER is an important organelle involved in protein folding, maintenance of calcium homeostasis and lipid biosynthesis. If cells are subjected to stressful situations, ER initiates a response to maintain cellular integrity (UPR), but in certain situations this response triggers cells to apoptosis [9]. Hypoxia and nutrient starvation are common features in cancer that induce misfolded protein accumulation, an important inducer of ER stress [58,59]. It is well known that ER stress is activated in solid tumors, and it has been linked to chemotherapy resistance [60,61]. Because ER stress is closely connected to apoptosis, regulation of ER stress could be involved in the pro-apoptotic actions of melatonin. Effect on the viability of hepatoma cells of other molecules, such as neferine or guggulsterone, associate to ER induction [62-64]. We evaluated the effect of melatonin on protein levels of BiP, a chaperone responsible for the proper folding of proteins in the ER [65], and found an increased expression in DEN-treated rats that received melatonin, indicating that the hormone was able to initiate the ER stress response. ATF6 is a sensor protein cleavage when ER stress is activated, leading to the release of an active form that promotes the translation of chaperone genes and CHOP [66], CHOP is a modulator of apoptosis regarding to its function as a transcription factor that increases the expression of pro-apoptotic proteins and downregulates anti-apoptotic genes [13,67,68]. Our finding that melatonin increases the expression of cleaved ATF6 and CHOP in rats with HCC suggests that ER stress could be responsible, in part, for the enhancement of apoptosis in our model. Effects of melatonin on ER stress have been evaluated in HePG2 with the co-administration of an ER inducer, and it has been shown that melatonin treatment enhanced the levels of CHOP and decreased the Bcl-2/Bax ratio [22]. Moreover, it has

been reported that melatonin strengthens the apoptotic effect of doxorubicin under ER stress conditions in HepG2 and SMMC-7721 hepatoma cell lines [23].

Since COX-2 inhibition has been shown to increase apoptosis in tunicamycin-treated HepG2 cells through induction of CHOP expression and downregulation of bcl-2/Bax ratio, it has been proposed to be a target molecule for HCC treatment [22]. Our results demonstrate that DEN treatment caused an increase in COX-2 protein levels while melatonin co-administration partially restored normal levels. COX-2 activity is inhibited by melatonin in HepG2 and SMMC-7721 cells, and blocking of AKT activation results in lowered COX-2 expression [69]. Therefore, suppression of the COX-2/PI3K/AKT pathway could contribute to induction of apoptosis through ER stress by melatonin. Other proteins such as forkhead box O3 (FOXO3) [19] or mitogen-activated protein kinases (MAPK) such as c-Jun N-terminal kinase (JNK) [17] could also play a role in melatonin-induced apoptosis in HepG2 cells. In this regard, JNK phosphorylation is altered during melatonin treatment in HepG2 cells [17], so it could be the link between ER stress and apoptosis since it has been demonstrated that its activation is induced under ER stress conditions and regulates apoptotic gene expression [70]. Therefore, more studies in the DEN model of HCC are necessary to confirm the findings obtained *in vitro*.

Previous reports have demonstrated that HCC is established between 17-19 weeks of DEN administration, while inflammation starts after 4-5 weeks and cirrhosis appears 10-12 weeks after DEN injection [27]. Melatonin treatment was initiated in our study beginning 5 or 12 weeks after the start of DEN administration to assess effects when different degrees of liver damage were present. Although melatonin did not cause significant differences in most markers of apoptosis according to the time of administration, GST-P expression was notably lower when melatonin administration started during cirrhosis establishment. A previous study has shown that resveratrol

interferes with DEN-induced HCC at early and advanced stages, although in terms of the rate of caspase activation data obtained indicated a higher rate of conversion in the advanced stage [37]. Differences among both studies could be related to the experimental design of DEN administration. However, we also observed that, although ER stress increased in the two groups of rats receiving DEN and melatonin, administration of the indole in the advanced-stage resulted in a higher capacity for ATF6 and CHOP induction, which suggests an increased/demand requirement for the induction of apoptosis. Data obtained indicate that melatonin could have different effects on molecular pathways depending on the degree of hepatic injury, and further study is required.

Conclusions

Our research demonstrates that melatonin administrated during inflammation or cirrhosis progression acts as a powerful pro-apoptotic agent able to ameliorate histology and biochemical outcomes in DEN-induced HCC. Moreover, melatonin also induces an ER stress response that could be linked to the apoptotic effects observed. However, it is necessary to determine the signaling pathways that regulate both processes with the aim to potentiate the therapeutic applications of melatonin in HCC treatment.

Acknowledgements

CIBERehd is granted by Instituto de la Salud Carlos III, Spain. Raquel Ordoñez is supported by the program “Formación del Profesorado Universitario” (Becas FPU, reference FPU12/01433) from the Ministry of Education (Spain). This study was supported by grants from the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NPM, JLM, JGG. Performed the experiments: AJM, RO, CTC, JNP. Analyzed the data: AJM, RO, CTC, JNP, NPM, JLM, JGG. Wrote the paper: AJM, RO, NPM, JLM, JGG

References

1. Ferrin G, Aguilar-Melero P, Rodriguez-Peralvarez M, Montero-Alvarez JL, de la Mata M. Biomarkers for hepatocellular carcinoma: diagnostic and therapeutic utility. *Hepat Med.* 2015;7:1-10. doi: 10.2147/HMER.S50161. PMID: 25926760.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516. PMID: 21351269.
3. Forner A LJ, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012; 379(9822):1245-55. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0. PMID: 22353262.
4. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009;124(3):511-5. doi: 10.1002/ijc.24064. PMID: 19003982.
5. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8. PMID: 9721089.
6. Cosentino K, Garcia-Saez AJ. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids.* 2014;181:62-75. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2014.04.001. PMID: 24732580.
7. Wurstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res.* 2012;318(11):1213-20. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.013. PMID: 22406265.
8. Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2015;31:84-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.05.002. PMID: 24859747.
9. Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev.* 2014;19(2):75-88. doi: 10.15430/JCP.2014.19.2.75. PMID: 25337575.
10. Nagelkerke A, Bussink J, Mujcic H, Wouters BG, Lehmann S, Sweep FC, et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-

- arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Res.* 2013;15(1):R2. doi: 10.1186/bcr3373. PMID: 23294542.
11. Su R, Li Z, Li H, Song H, Bao C, Wei J, et al. Grp78 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:20. doi: 10.1186/1471-2407-10-20. PMID: 20082722.
 12. Muchowicz A, Firczuk M, Wachowska M, Kujawa M, Jankowska-Steifer E, Gabrysiak M, et al. SK053 triggers tumor cells apoptosis by oxidative stress-mediated endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol.* 2015;93(4):418-27. doi: 10.1016/j.bcp.2014.12.019. PMID: 25573101.
 13. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001;21(4):1249-59. doi: 10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001. PMID: 11158311.
 14. Wang Z, Jiang C, Chen W, Zhang G, Luo D, Cao Y, et al. Baicalein induces apoptosis and autophagy via endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:732516. doi: 10.1155/2014/732516. PMID: 24995326.
 15. Cutando A, Lopez-Valverde A, Arias-Santiago S, J DEV, RG DED. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res.* 2012;32(7):2747-53. PMID: 22753734.
 16. Tomov B, Popov D, Tomova R, Vladov N, Den Otter W, Krastev Z. Therapeutic response of untreatable hepatocellular carcinoma after application of the immune modulators IL-2, BCG and melatonin. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4531-5. PMID: 24123026.
 17. Martin-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andres O, Gonzalez P, Gonzalez-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma

- HepG2 cell line. *J Pineal Res.* 2008;45(4):532-40. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00641.x. PMID: 19012662.
18. Carbajo-Pescador S, Garcia-Palomo A, Martin-Renedo J, Piva M, Gonzalez-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. *J Pineal Res.* 2011;51(4):463-71. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00910.x. PMID: 21718361.
 19. Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, et al. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer.* 2013;108(2):442-9. doi: 10.1038/bjc.2012.563. PMID: 23257900.
 20. Carbajo-Pescador S, Ordonez R, Benet M, Jover R, Garcia-Palomo A, Mauriz JL, et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1alpha and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *Br J Cancer.* 2013;109(1):83-91. doi: 10.1038/bjc.2013.285. PMID: 23756865.
 21. Ordonez R, Carbajo-Pescador S, Prieto-Dominguez N, Garcia-Palomo A, Gonzalez-Gallego J, Mauriz JL. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. *J Pineal Res.* 2014;56(1):20-30. doi: 10.1111/jpi.12092. PMID: 24117795.
 22. Zha L, Fan L, Sun G, Wang H, Ma T, Zhong F, et al. Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Pineal Res.* 2012;52(3):322-31. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00946.x. PMID: 22225575.
 23. Fan L, Sun G, Ma T, Zhong F, Lei Y, Li X, et al. Melatonin reverses tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells and improves cytotoxic response to doxorubicin by increasing CHOP and decreasing survivin. *J Pineal Res.* 2013;55(2):184-94. doi: 10.1111/jpi.12061. PMID: 23711089.

24. Subramanian P, Mirunalini S, Dakshayani KB, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. *J Pineal Res.* 2007;43(3):305-12. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00478.x. PMID: 17803529.
25. Dakshayani KB, Subramanian P, Manivasagam T, Essa MM, Manoharan S. Melatonin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Pharm Pharm Sci.* 2005;8(2):316-21. PMID: 16124941.
26. Rahman KM, Sugie S, Watanabe T, Tanaka T, Mori H. Chemopreventive effects of melatonin on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr Cancer.* 2003;47(2):148-55. doi: 10.1207/s15327914nc4702_7. PMID: 15087267.
27. Moreira A RG, Bona S, Cerski T, Marroni C, Muriz J, Gonzalez-Gallego J, Marroni N. Oxidative Stress and Cell Damage in a Model of Precancerous Lesions and Advanced Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Toxicology Reports.* 2015;2:8.
28. Molpeceres V, Mauriz JL, Garcia-Mediavilla MV, Gonzalez P, Barrio JP, Gonzalez-Gallego J. 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.* 2007;62(7):687-95. PMID: 17634314.
29. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21. PMID: 10737956.
30. Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Perez P, Gomez-Gonzalo M, Majano PL, Lopez-Cabrera M, et al. Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human

- hepatocyte-derived cells. *J Hepatol.* 2005;43(4):606-13. doi: 10.1016/j.jhep.2005.04.019. PMID: 16112247.
31. De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, Baroni GS, Benedetti A, Brenner D, et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis.* 2013;45(6):450-9. doi: 10.1016/j.dld.2012.10.008. PMID: 23177172.
32. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005;39(2):99-104. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x. PMID: 16098085.
33. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):573-89. doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.03.012. PMID: 16678784.
34. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine.* 2005;27(2):179-88. doi: 10.1385/ENDO:27:2:179. PMID: 16217131.
35. Sakai M, Muramatsu M. Regulation of glutathione transferase P: a tumor marker of hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(3):575-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.174. PMID: 17434454.
36. Imamoto R, Okano JI, Sawada S, Fujise Y, Abe R, Murawaki Y. Null anticarcinogenic effect of silymarin on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Ther Med.* 2014;7(1):31-8. doi: 10.3892/etm.2013.1391. PMID: 24348760.
37. Rajasekaran D, Elavarasan J, Sivalingam M, Ganapathy E, Kumar A, Kalpana K, et al. Resveratrol interferes with N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma at early and advanced stages in male Wistar rats. *Mol Med Rep.* 2011;4(6):1211-7. doi: 10.3892/mmr.2011.555. PMID: 21850372.

38. Yi X, Long L, Yang C, Lu Y, Cheng M. Maotai ameliorates diethylnitrosamine-initiated hepatocellular carcinoma formation in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):e93599. doi: 10.1371/journal.pone.0093599. PMID: 24690765.
39. Liu R, Fu A, Hoffman AE, Zheng T, Zhu Y. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. *BMC Cell Biol*. 2013;14:1. doi: 10.1186/1471-2121-14-1. PMID: 23294620.
40. Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS, Daoud S. Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011;54(3):857-67. doi: 10.1002/hep.24433. PMID: 21607999.
41. Kowsalya R, Kaliaperumal J, Vaishnavi M, Namasivayam E. Anticancer activity of *Cynodon dactylon* L. root extract against diethyl nitrosamine induced hepatic carcinoma. *South Asian J Cancer*. 2015;4(2):83-7. doi: 10.4103/2278-330X.155691. PMID: 25992348.
42. Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(23):8441-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1646. PMID: 16322307.
43. Hadem KL, Sharan RN, Kma L. Inhibitory potential of methanolic extracts of *Aristolochia tagala* and *Curcuma caesia* on hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in BALB/c mice. *J Carcinog*. 2014;13:7. doi: 10.4103/1477-3163.133520. PMID: 25191135.
44. Balamurugan K, Karthikeyan J. Evaluation of Luteolin in the Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced Hepatocellular Carcinoma Using Animal Model System. *Indian J Clin Biochem*. 2012;27(2):157-63. doi: 10.1007/s12291-011-0166-7. PMID: 23543260.

45. Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, et al. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.* 2012;360(1-2):51-60. doi: 10.1007/s11010-011-1043-7. PMID: 21879312.
46. Mauriz JL, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. Apoptotic signaling pathways as a target for the treatment of liver diseases. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8(14):1485-93. PMID: 19075806.
47. Fan LL, Sun GP, Wei W, Wang ZG, Ge L, Fu WZ, et al. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 2010;16(12):1473-81. PMID: 20333787.
48. Gao Y, Li HX, Xu LT, Wang P, Xu LY, Cohen L, et al. Bufalin enhances the anti-proliferative effect of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cells through downregulation of ERK. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1683-9. doi: 10.1007/s11033-011-0908-x. PMID: 21617941.
49. Ghosh D, Choudhury ST, Ghosh S, Mandal AK, Sarkar S, Ghosh A, et al. Nanocapsulated curcumin: oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *Chem Biol Interact.* 2012;195(3):206-14. doi: 10.1016/j.cbi.2011.12.004. PMID: 22197969.
50. Sivaramakrishnan V, Devaraj SN. Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model. *Chem Biol Interact.* 2010;183(2):284-92. doi: 10.1016/j.cbi.2009.11.011. PMID: 19931519.
51. Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1071-80. doi: 10.1038/cdd.2015.50. PMID: 25952548.

52. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997;275(5302):967-9. PMID: 9020077.
53. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005;435(7042):677-81. doi: 10.1038/nature03579. PMID: 15902208.
54. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013;19(2):202-8. doi: 10.1038/nm.3048. PMID: 23291630.
55. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(1):60-6. PMID: 11790556.
56. Bejarano I, Espino J, Marchena AM, Barriga C, Paredes SD, Rodriguez AB, et al. Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol Cell Biochem*. 2011;353(1-2):167-76. doi: 10.1007/s11010-011-0783-8. PMID: 21431366.
57. Perdomo J, Cabrera J, Estevez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J Pineal Res*. 2013;55(2):195-206. doi: 10.1111/jpi.12062. PMID: 23725013.
58. Tsai YC, Weissman AM. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer*. 2010;1(7):764-78. doi: 10.1177/1947601910383011. PMID: 21331300.

59. Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D, et al. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*. 2010;5(3):e9575. doi: 10.1371/journal.pone.0009575. PMID: 20221394.
60. Feng R, Zhai WL, Yang HY, Jin H, Zhang QX. Induction of ER stress protects gastric cancer cells against apoptosis induced by cisplatin and doxorubicin through activation of p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406(2):299-304. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.036. PMID: 21320468.
61. Wu XY, Fan RT, Yan XH, Cui J, Xu JL, Gu H, et al. Endoplasmic reticulum stress protects human thyroid carcinoma cell lines against ionizing radiation-induced apoptosis. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):2341-7. doi: 10.3892/mmr.2014.2956. PMID: 25405642.
62. Yoon JS, Kim HM, Yadunandam AK, Kim NH, Jung HA, Choi JS, et al. Neferine isolated from *Nelumbo nucifera* enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response. *Phytomedicine*. 2013;20(11):1013-22. doi: 10.1016/j.phymed.2013.03.024. PMID: 23746959.
63. Moon DO, Park SY, Choi YH, Ahn JS, Kim GY. Guggulsterone sensitizes hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through the induction of CHOP-dependent DR5: involvement of ROS-dependent ER-stress. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(11):1641-50. doi: 10.1016/j.bcp.2011.08.019. PMID: 21903093.
64. Lu WL, Ren HY, Liang C, Zhang YY, Xu J, Pan ZQ, et al. Akebia trifoliata (Thunb.) Koidz Seed Extract Inhibits the Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines via Inducing Endoplasmic Reticulum Stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:192749. doi: 10.1155/2014/192749. PMID: 25389441.

65. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107(7):881-91. PMID: 11779464.
66. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct*. 2008;33(1):75-89. PMID: 18360008.
67. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007;129(7):1337-49. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.027. PMID: 17604722.
68. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45495-502. doi: 10.1074/jbc.M406933200. PMID: 15322075.
69. Fan L, Sun G, Ma T, Zhong F, Wei W. Melatonin overcomes apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting survivin and XIAP. *J Pineal Res*. 2013;55(2):174-83. doi: 10.1111/jpi.12060. PMID: 23679681.
70. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3460-70. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028. PMID: 23850759.

Figure legends

Fig. 1. Effect of DEN and treatment with melatonin on HCC development. (A) Histologic assessment of liver sections from control (CO), control rats treated with melatonin (CO+MEL), DEN-treated rats (DEN), and DEN and melatonin treated rats beginning 5 or 12 weeks after the start of DEN administration (DEN+MEL5 and DEN+MEL12, respectively). The livers of CO and CO+MEL had normal architecture, and DEN treatment induced advanced HCC. Treatment with melatonin resulted in a significant amelioration in histologic changes; DEN+MEL5 showed only some dysplastic foci (N), and DEN+MEL12 multiple nodules of regeneration (NR), precancerous lesions (PL) with fibrosis and cirrhotic pattern (arrows). (B) Representative Western blot and densitometric quantification of GST-P protein levels. Equal loading of protein was assessed by β -actin analyses. Values are expressed as means \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, compared with control (CO), # $p < 0.05$, compared with DEN.

Fig. 2. Effect of DEN and treatment with melatonin on markers of apoptosis. (A) caspase 3 activity was analysed with a fluorescent analogue of caspase 3 substrate and fluorescence measurement. (B) Histologic assessment of activated caspase 3 showed a higher expression in DEN plus melatonin groups compared to controls (200x). (C) Representative Western blot and densitometric quantification of PARP cleavage. Equal loading of proteins was assessed by β -actin analyses. Values are expressed as means \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, compared with control (CO) # $p < 0.05$, compared with DEN.

Fig. 3. Effect of DEN and treatment with melatonin on the intrinsic pathway of apoptosis. (A) Representative Western blot of intrinsic apoptotic proteins p53, bcl-2, Bax and cytochrome c in the cytosolic fraction, and caspase 9 activity. Equal loading of proteins was assessed by β -actin analyses. (B) Densitometric quantification of Western blots. Values are expressed as means \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, compared with control (CO), # $p < 0.05$, compared with DEN.

Fig. 4. Effect of DEN and treatment with melatonin on the extrinsic pathway of apoptosis. (A) caspase 8 activity was analysed with a fluorescent analogue of caspase 8 substrate and fluorescence measurement. (B) Representative Western blot and densitometric quantification of Fas-L. Equal loading of protein was assessed by β -actin analyses. Values are expressed as means \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, compared with control (CO), # $p < 0.05$, compared with DEN.

Fig. 5. Effect of DEN and treatment with melatonin on markers of ER stress and COX-2. (A) Representative Western blot of BiP, ATF6 p60, CHOP and COX-2. Equal loading of proteins was assessed by β -actin analyses. (B) Densitometric quantification of Western blots. Values are expressed as means \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, compared with control (CO), # $p < 0.05$, compared with DEN, & $p < 0.05$ compared with DEN+MEL5.

Tables

Table 1. Effects of DEN and melatonin on serum enzyme levels and hepatosomatic ratio (HSR)

Marker	Group				
	CO	CO+MEL	DEN	DEN+MEL5	DEN+MEL12
AST (U/L)	132 ± 15.5	107 ± 7.7	235 ± 71*	166 ± 59*#	143 ± 28*#
ALT (U/L)	79 ± 6	54 ± 15	124 ± 39*	102 ± 37*#	96 ± 19*#
AP (U/L)	182 ± 42	111 ± 50	316 ± 99*	215 ± 98*#	213 ± 46*#
GGT (U/L)	7.8 ± 2.5	9.0 ± 2.1	50.3 ± 9.0*	35.8 ± 11.0*#	25.1 ± 9.0*#
HSR (%)	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.3	10.8 ± 5.0*	4.6 ± 1.2#	4.2 ± 0.7#

AST, aspartate aminotransferase; *ALT*, alanine aminotransferase; *AP*, alkaline phosphatase; *GGT*, gamma-glutamyl transferase; *HSP*, hepatosomatic ratio.

Values are expressed as means ± standard error of the mean.

*p<0.05, compared with control (CO).

#p<0.05 compared with DEN.

&p<0.05 compared with DEN+MEL5.

Table 2. Comet assay in the peripheral blood and liver from rats treated with DEN and melatonin

Tissue	Group	Damage Index	Damage frequency
Blood	CO	7.6 ± 7.1	3.4 ± 3.4
	CO+MEL	7.0 ± 5.1	3.9 ± 4.4
	DEN	9.3 ± 5.1	6.3 ± 2.2
	DEN+MEL5	7.0 ± 2.4	6.4 ± 2.4
	DEN+MEL12	8.7 ± 3.3	7.7 ± 3.0
Liver	CO	95.8 ± 27.6	74.6 ± 17.9
	CO+MEL	96.5 ± 17.6	79.5 ± 16.9
	DEN	339.3 ± 56.5*	99.0 ± 2.0*
	DEN+MEL5	259.0 ± 42.8*#	92.3 ± 5.6
	DEN+MEL12	119.6 ± 17.9 *#&	60.7 ± 5.0*#&

Damage index can range from 0 (completely undamaged) to 400 (with maximum damage); damage frequency was calculated based on the number of cells with tail versus those with no tail.

Values are expressed as means + standard error of the mean.

* $p < 0.05$, compared with control (CO).

$p < 0.05$ compared with DEN.

& $p < 0.05$ compared with DEN+MEL5.

A.

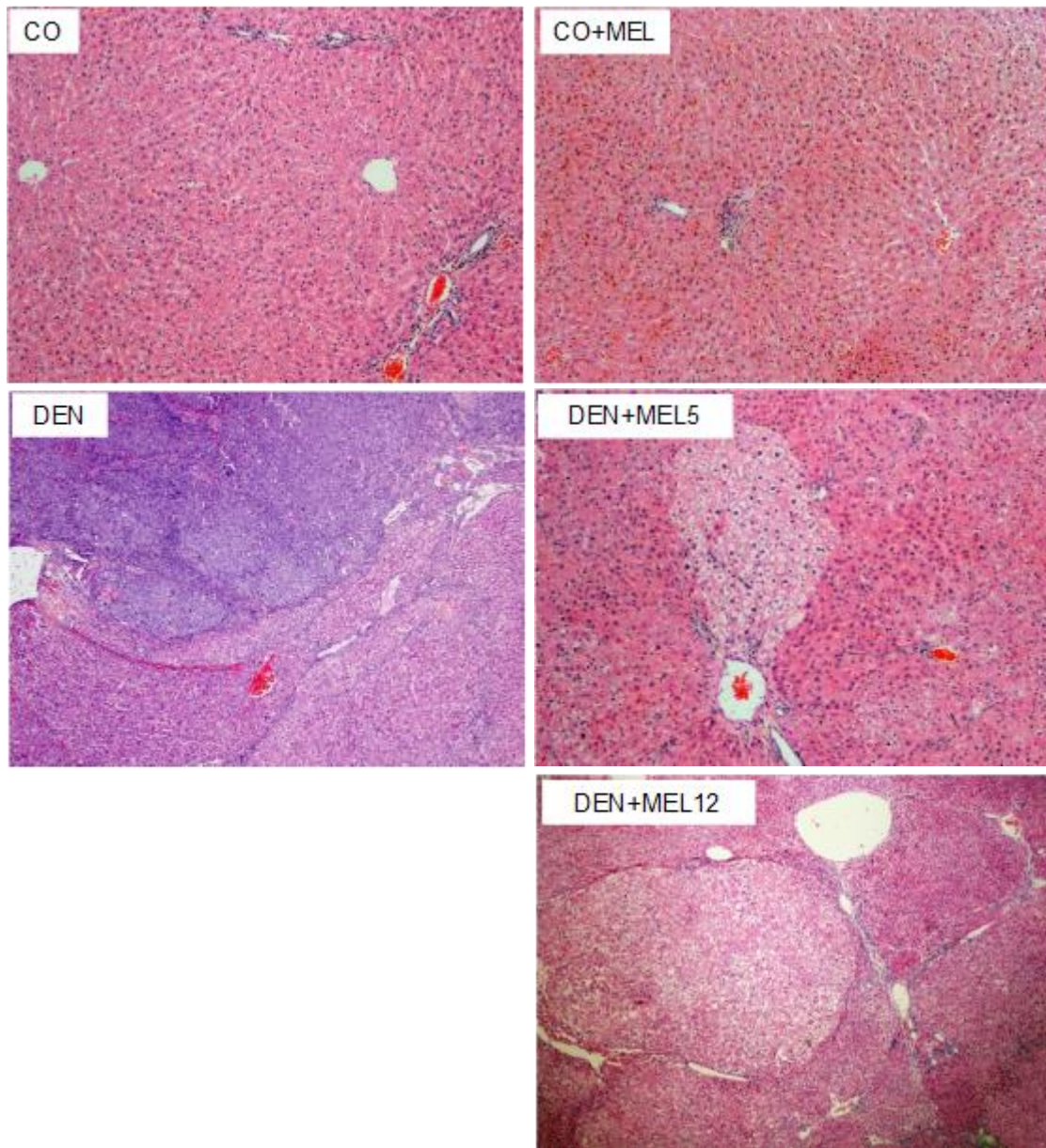


Figure 1 A

B

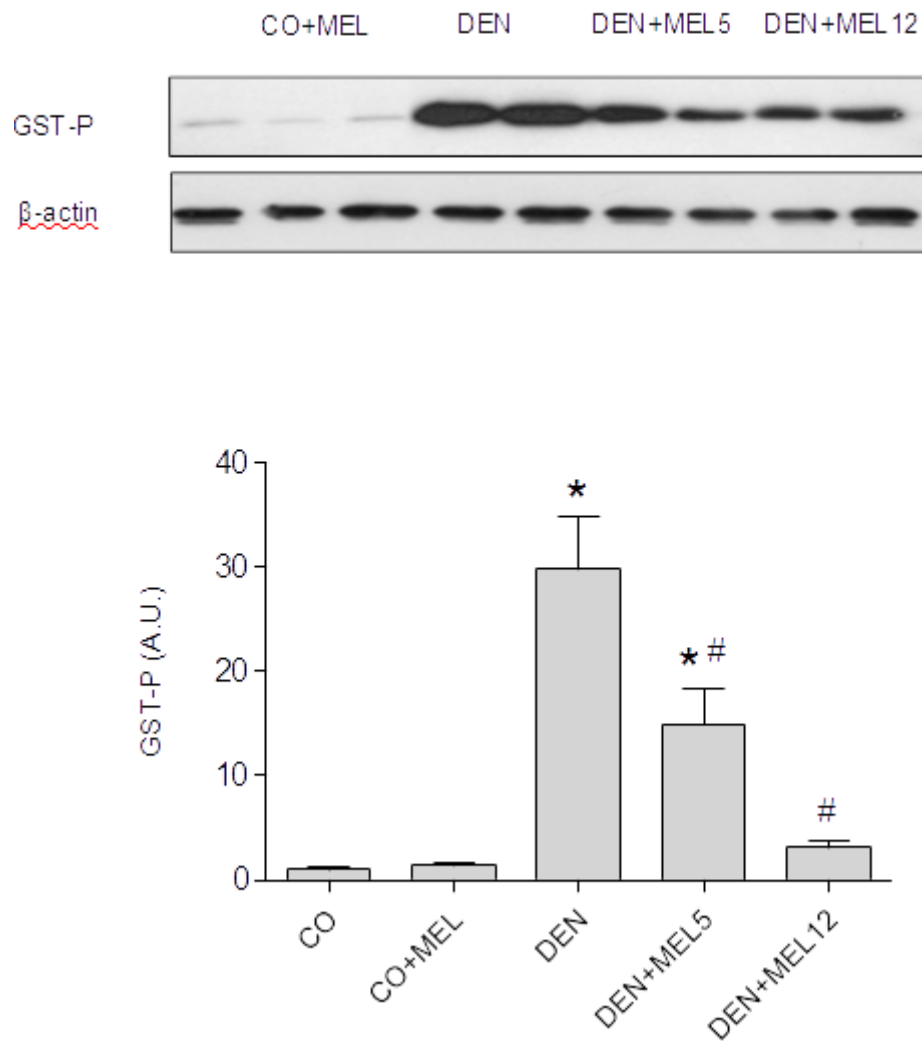


Figure 1B

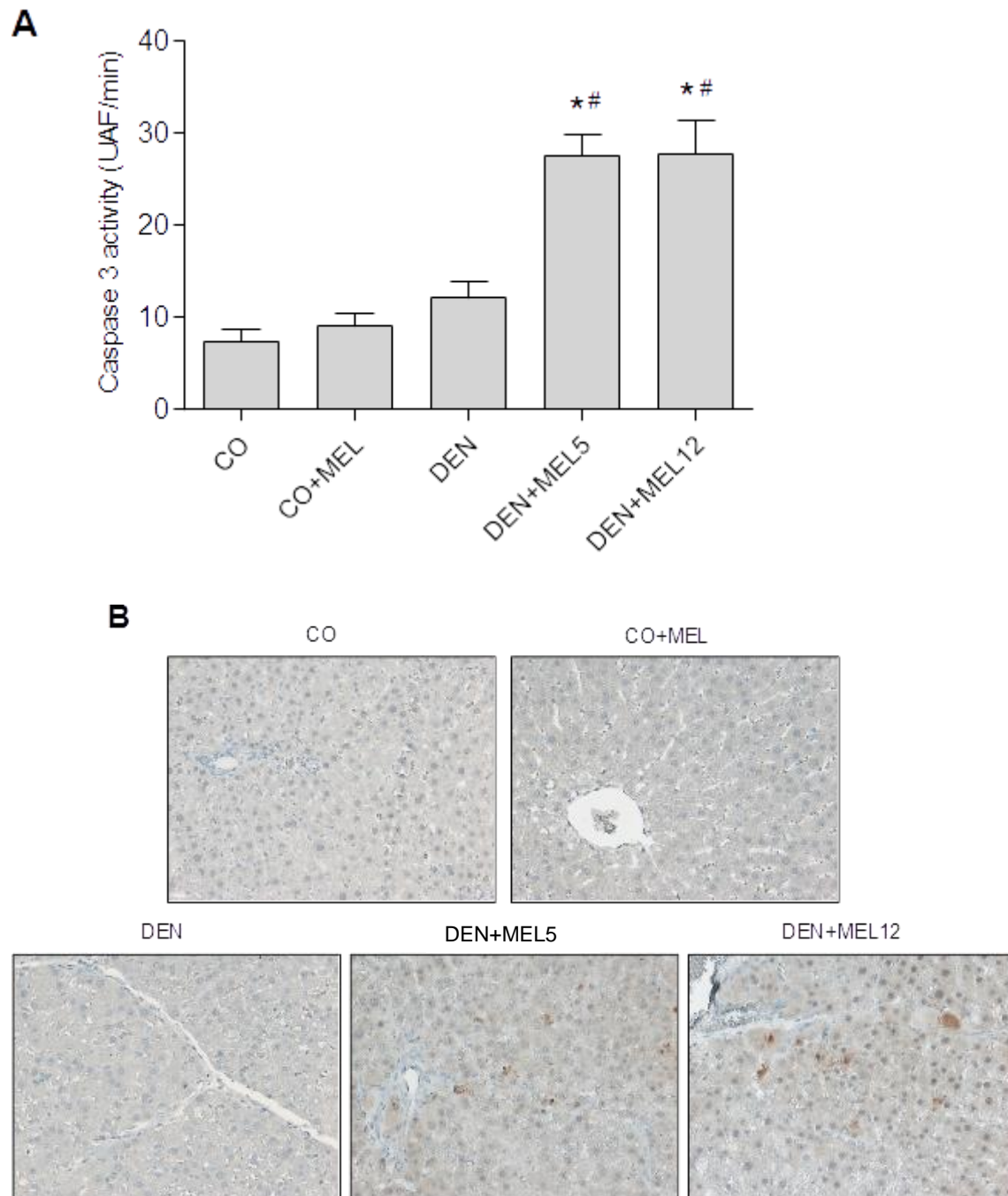


Figure 2 A e B

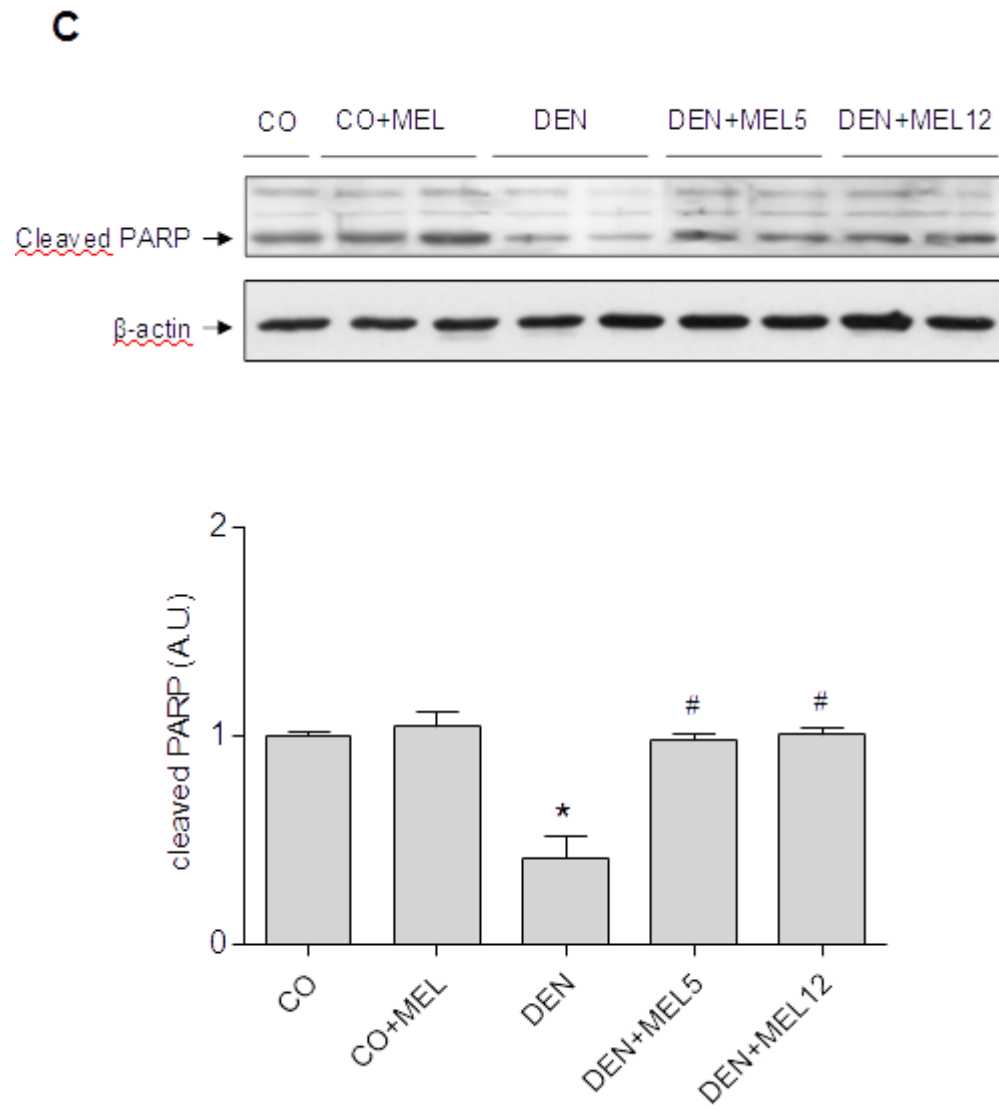


Figure 2 C

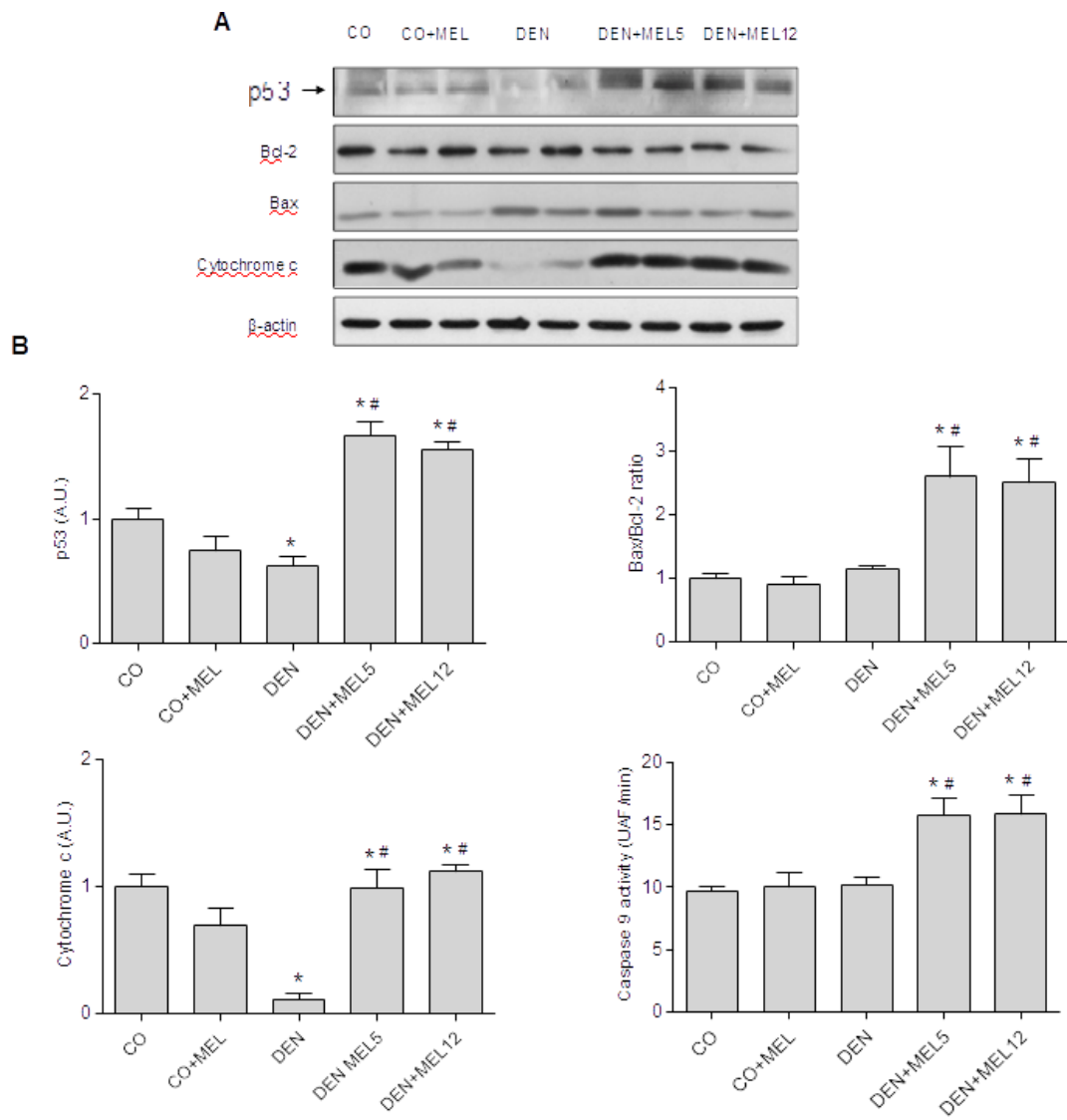


Figure 3 A e B

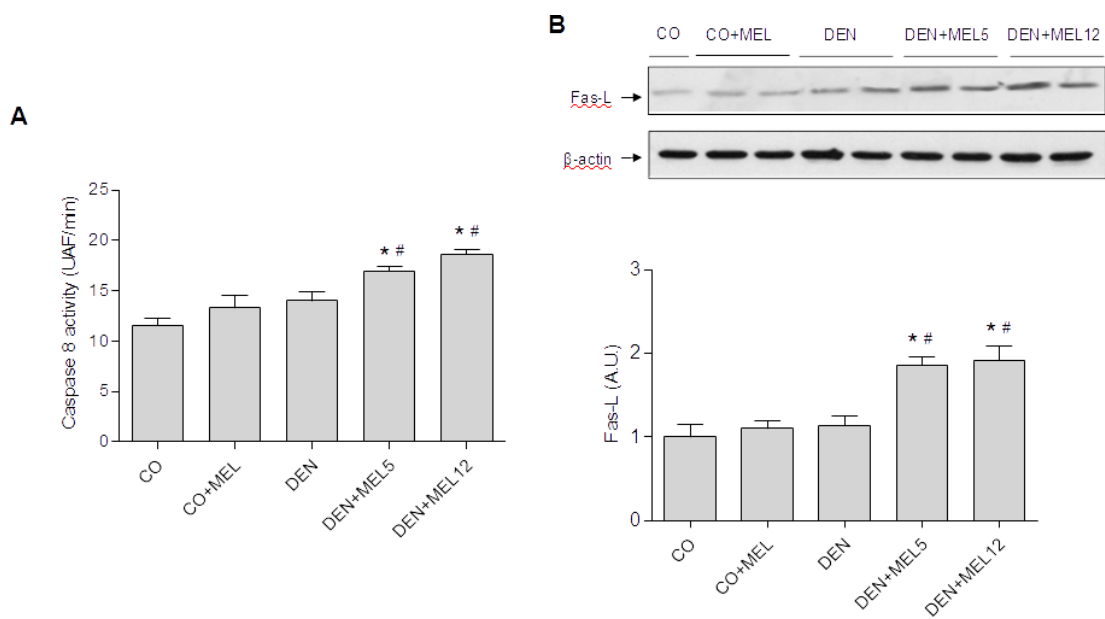


Figure 4 A e B

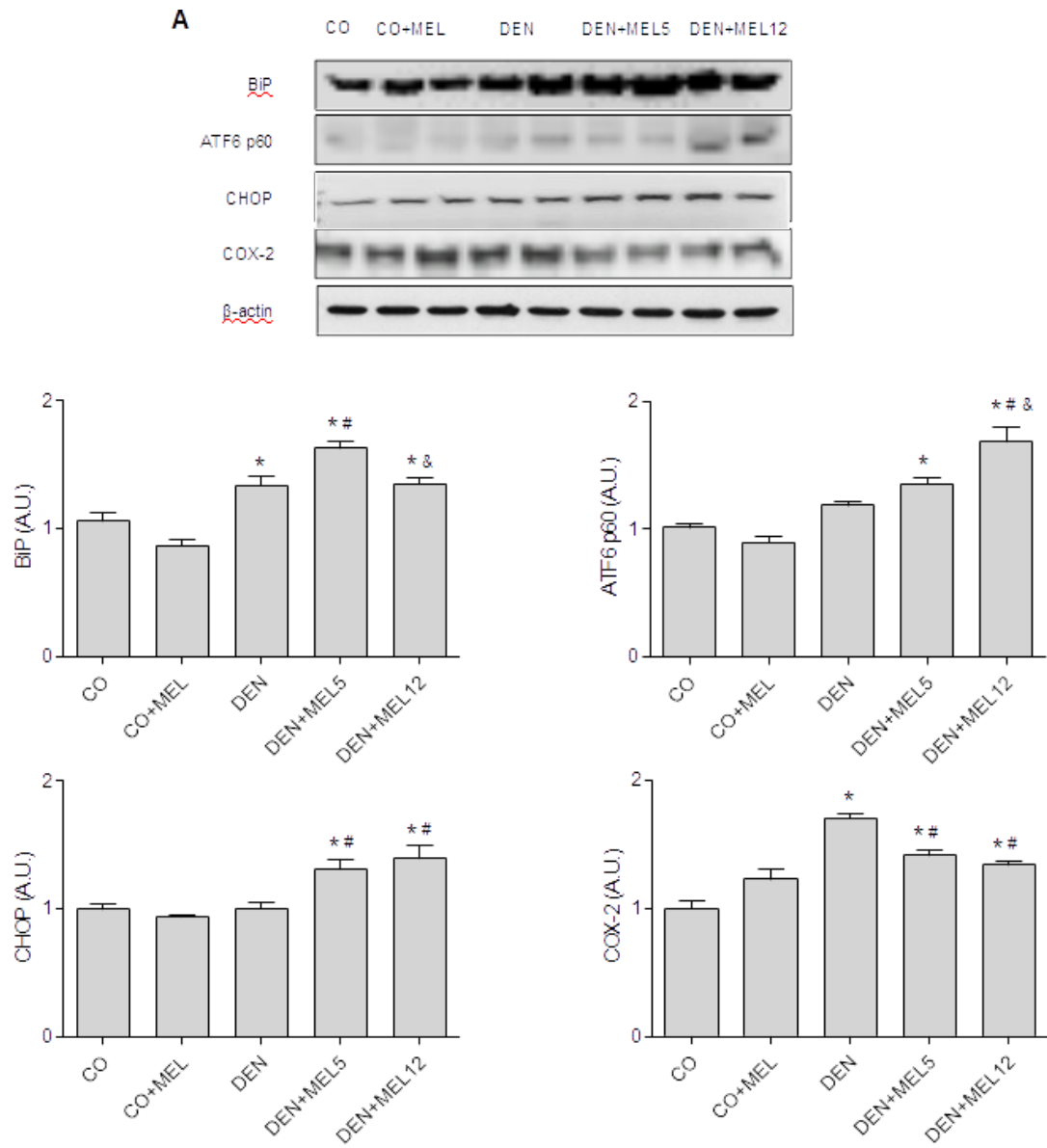


Figure 5

B

Discussão Geral

5 DISCUSSÃO

Estabelecer a hepatocarcinogênese experimental tem sido alvo de estudos há décadas. O *Experimento I* buscou desenvolver o modelo experimental de carcinoma hepatocelular por indução química. Dentre as substâncias químicas, para indução do câncer, a que mais se destaca é dietilnitrosamina (DEN) (Heindryckx et al., 2009). DEN é um potente agente hepatocarcinogênico (Williams et al., 1996), que é hidrolisado em nitrosamina, gerando radical eletrofílico, responsável pela instabilidade gênica (Malik et al., 2013).

O modelo experimental foi desenvolvido a partir de várias referências bibliográficas, que contribuíram de alguma forma para construir a proposta final. As tentativas de reproduzir uma metodologia já descrita foram fracassadas e, por isso, buscamos o estabelecimento de um modelo próprio, com base em autores que já haviam estudando o assunto e em estudo piloto realizado previamente. Traçamos estratégias importantes para estabelecermos o desenho experimental. Com base na literatura, avaliamos as doses mais utilizadas (50 a 200 mg), as vias de administração (ip, oral, na água de beber); o uso ou não de fenobarbital; com ou sem acetilaminofluoreno (2-AAF); administração contínua ou intermitente de DEN (para proporcionar períodos de recuperação). Usamos animais de idades diferentes (adultos no estudo piloto¹ e animais jovens nos Experimentos I e II) (Farber et al., 1977; Park et al., 2009; Heindryckx et al., 2009; Nagahara et al., 2010; Tan et al., 2012; Malik et al., 2013).

Realizamos vários ensaios ao longo destes 3 anos, que nos forneceram informações relevantes para definir com maior segurança os protocolos experimentais. No estudo piloto que utilizou o DEN de forma contínua por 16 semanas, apesar do insucesso no desenvolvimento do CHC, desenvolvemos um modelo de cirrose hepática experimental (Bona et al., 2015). Também, observamos neste estudo, que após a 6^a semana os animais perdiam muito peso, o que resultava na morte por intoxicação, sinalizando a necessidade de haver período de interrupção da indução.

¹ O estudo piloto foi registrado no CEP/HCPA/FIPE sob o nº 09588, e os resultados foram publicados no artigo *Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study*, *Protoplasma*, 2015 may 252 (3) 825-33. Anexo C.

Para descrever o protocolo DEN50 e DEN75 do experimento I esta observação foi levada em consideração. Nestes grupos, após 6 semanas de DEN, eram suspensas as induções por um período de 1 mês (interrupção da indução por 4 semanas) para que os animais recuperassem seu peso, evitando a morte precoce por intoxicação promovido pela droga. Após este período, a indução era reiniciada por mais 3 semanas, por isso a denominação de modelo crônico e intermitente de exposição ao agente carcinogênico. Esta suspensão na 7ª semana é vital para garantir a sobrevivência dos grupos até a 19ª semana. O grupo DEN100 seguiu as mesmas diretrizes, diferenciando-se na dose mais alta (100mg/Kg) e na menor frequência entre as doses (1x a cada 6 semanas por 7 meses de acompanhamento).

Salientamos que para promover o CHC experimental é necessário a combinação entre dose e repetição. Esta combinação é muito sensível, pois quando o animal é exposto à dose única de DEN, tem condições de reparar a lesão; porém quando a dose é contínua e alta, o animal tem alto risco de ir a óbito por falência hepática.

O DEN foi utilizado em associação ao acetilaminofluoreno (2-AAF) que é um promotor tumoral e inibidor proliferativo (Farber et al., 1977; Malik et al., 2013). Farber et al., (1977) descreveram o clássico modelo de CHC por cirurgia + indução química. Este modelo parte do princípio que a retirada de $\frac{3}{4}$ do fígado atua como agente estimulador para iniciar a regeneração hepática. Então, concomitante com a atividade mitótica, era administrado DEN e 2-AAF, potentes agentes promotores do câncer. Com base nestas informações, identificamos no nosso experimento o momento em que ocorria o estímulo regenerativo, pois tínhamos avaliado, no estudo piloto, o tamanho do fígado em várias semanas de uso do DEN (4ª, 6ª, 10ª semana). Dentre todas estas semanas, observamos que na 4ª semana a relação hepatossomática era de 2% do peso corporal, na 6ª semana 3% e somente na 10ª semana que a relação voltava a normalidade de 4%. Com base neste acompanhamento, administramos dose única de 100mg/Kg de 2-AAF na 4ª semana, exato momento de maior perda de massa hepática e início do processo de regeneração (Bagnyukova et al., 2008; Malik et al., 2013).

Outro ponto relevante é a escolha dos animais, que devem ser jovens e machos porque segundo Vesselinovitch e Mihailovich (1983), o CHC ocorre mais em animais jovens, em função das altas taxas proliferativas de hepatócito e, o hormônio masculino favorece o desenvolvimento do câncer. Depois de definido o gênero e idade dos animais,

foram estabelecidos os grupos testes - DEN50, DEN75 e DEN100 (*ver figura 11*). Na sequência seguem as análises dos três protocolos quanto a aspectos somáticos, bioquímicos e histológicos.

Os grupos DEN50 e DEN75 apresentaram maior sinal de perda de peso, por isso foi necessário a interrupção da administração de DEN na 6ª semana, retornando somente na 11ª. Esta ação ameniza o risco de falência hepática, consequentemente o óbito. No protocolo DEN100, os animais apresentavam menos efeitos colaterais do DEN, não perderam peso e nenhum animal morreu durante o acompanhamento.

As análises das enzimas transaminases apresentaram aumento tanto para AST como para ALT, caracterizando quadro de lesão hepatocelular por necrose ou alteração da permeabilidade de membrana celular. Salientamos que o DEN50 teve os valores mais alterados comparados aos outros dois grupos. A determinação das enzimas canaliculares, - fosfatase alcalina e γ GT - comprovou aumento significativo no grupo DEN50 em comparação ao controle. Este aumento sinaliza doença colestática e obstrutiva. Em vista das dimensões das massas tumorais encontradas, acredita-se que os nódulos tumorais causaram compressões sobre ductos biliares. Novamente, o DEN50 foi o que teve maior alteração entre os 3 grupos testados (Tabela 3).

Na 19ª semana, os fígados dos animais DEN50 estavam pardos, com nodulações difusas ou com massa única e grande. As bordas estavam rombas e com pontos de necrose. O baço encontrava-se aumentado e com coloração normal. Não foi observado ascite. Estas alterações são compatíveis com doença cirrótica seguida de tumor. Outro fato que é conclusivo para a formação das nodulações é a relação hepatossomática do DEN50. O aumento de 3% (CO) para 12% observado no DEN50 é resultado do tamanho dos nódulos e da massa tumoral visível. DEN100 apresentou nódulos pequenos e difusos, não alterando a relação hepatossomática (Figura 15).

A avaliação macroscópica pode predizer 4 padrões: massa unifocal, formando um nódulo único geralmente grande; nódulos multifocais de tamanhos variáveis, amplamente distribuídos; câncer difusamente infiltrativo, sem áreas definida, permeando extensamente e envolvendo todo o fígado e lesões pré-cancerosas. O DEN50 foi o protocolo mais agressivo na formação do tumor e em menor tempo de latência. DEN100

teve lesões mais brandas em um tempo de latência longo. DEN75 teve padrão heterogêneo, apresentando fígados normais, cirróticos, com CHC inicial e avançado.

A análise histopatológica foi embasada nos estudos de Thoolen et al., (2010, 2012). A histologia do grupo DEN50 foi conclusiva para CHC (Figuras 17b, 17e). Os sinais observados incluem: células com núcleos alargados, hepatócitos extremamente atípicos, núcleo localizado centralmente, incremento da razão núcleo/citoplasma, aumento no índice de mitose, perda do parênquima hepático normal com presença de padrão pseudoacinar e trabecular. O grupo DEN100 teve aspecto histológico para displasia de baixo grau com lesões pré-cancerosas, com nucléolos proeminentes, focos de aumento na densidade celular, septo de fibrose com nódulos regenerativos, típico de cirrose. O grupo DEN75 foi o mais heterogêneo, pois apresentou tanto sinais de malignidade quanto focos de displasias (Thoolen et al., 2010; Thoolen et al., 2012).

O modelo descrito nesta tese é denominado de exposição crônica e intermitente ao agente carcinogênico (Reuber, 1965). Esta metodologia foi possível evidenciar carcinoma hepatocelular avançado (CHC avançado) no grupo DEN50 e lesões pré-cancerosas (PL) no grupo DEN100 pela avaliação somática, histopatológica e bioquímica. O grupo DEN75 teve comportamento muito heterogêneo, sendo desaconselhável seu uso para estudo da carcinogênese hepática experimental.

Então, os protocolos DEN50 e DEN100 atenderam os critérios estabelecidos por Terblanche e Hickman, (1991) como modelo experimental; e por esta razão foram utilizados para os estudos subsequentes. Os critérios são:

- *Ser reversível:* os modelos produziram o CHC em 19 semanas e PL em 28 semanas e permitiram a sobrevivência dos animais até o final do processo.
- *Reproduzir a doença:* foram capazes de reproduzir a clínica da carcinogênese e a extensão da lesão hepática, permitindo sua avaliação.
- *Ser reproduzido:* quando seguidas as etapas do desenho experimental é possível caracterizar o CHC inicial e avançado, passando pelos momentos de inflamação/cirrose/ neoplasia.
- *A morte:* a morte deve ter relação com a doença estudada. A morte dos animais foi resultado direto do dano causado pelo tumor, após 16ª semana os animais morriam por hemorragia ou ruptura do tumor.

- Ter *janela terapêutica*: o modelo deve possuir tempo suficiente para a investigação e o tratamento. O protocolo DEN50 estabelece quatro janelas terapêuticas: 5ª semana fase inflamatória; 12ª semana fase cirrótica; 15ª semana CHC inicial e 19ª semana CHC avançado.
- *Animal adequado*: os ratos machos jovens responderam melhor a carcinogênese, que os ratos machos adultos.
- *Baixo Risco ao pesquisador*: DEN e 2-AAF são produtos químicos altamente tóxicos, devem ser manuseados na capela, com equipamentos de proteção individual, como máscara, luvas e óculos. Os materiais contaminados devem ser descartados no lixo apropriado para substâncias carcinogênicas ou quimioterápicas.

A continuação deste estudo segue com a comparação do CHC avançado (grupo DEN50) e lesões pré-cancerosas - PL (grupo DEN100) quanto à fibrose, presença de estresse oxidativo e dano celular, publicado no seguinte artigo:

Artigo 1: Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats, Toxicology Reports 2 (2015) 333–340.

Os efeitos dos estágios do CHC sobre o desenvolvimento da fibrose foram avaliados pela quantificação da expressão do TGF-1 β e pela percentagem de fibrose (%) na histologia. A expressão de TGF-1 β foi significativamente aumentada nos animais com PL, enquanto que o depósito de fibrose foi mais proeminente nos animais com CHC avançado. Este resultado sugere que o TGF-1 β é primeiramente ativado na fase inicial do carcinoma. Devido a esta ativação, células satélites (HSC) respondem com intenso depósito de fibrose observada no grupo CHC avançado. Existem evidências que TGF-1 β pode atuar como promotor da carcinogênese por ativar HSC, células estromais e promover a angiogênese (Gressner et al., 2007; Sakamoto et al., 2010; Zhang e Friedman, 2012).

Além disso, o acúmulo de matriz extracelular pode levar ao aumento na proliferação e a redução da apoptose, fato que favorecem à carcinogênese. (Zhang e Friedman, 2012). Nós também estudamos o envolvimento do óxido nítrico (NO) no CHC avançado e nas PL, avaliando a expressão de eNOS e iNOS no extrato citoplasmático de fígado. A expressão da iNOS foi significativamente aumentada nos animais com CHC avançado,

enquanto a expressão da eNOS foi reduzida. Hanahan e Weinberg (2000, 2011) propuseram seis marcadores biológicos para o desenvolvimento do tumor. A expressão aumentada da iNOS ativa 3 dos 6 marcadores, isto ocorre por duas vias moleculares importante, IKK/ NF κ B e RAS/ ERK. Quando estas vias estão ativadas acionam fatores de transcrição gênica que controlam o crescimento celular, a angiogênese e a inibição da morte celular (Frau et al., 2010; Muntané e Mata, 2010). A redução da expressão da eNOS agrava o tumor, fato comprovado neste estudo. Decker et al., (2008) demonstraram que a presença de eNOS estava associada a poucos e pequenos tumores, porém ratos nocaute para eNOS $^{-/-}$ desenvolviam tumores maiores e em maior quantidade. Acredita-se que a disfunção vascular, vista nas doenças crônicas hepáticas, seja importante sinal que precede o estabelecimento do carcinoma (Decker et al., 2008).

O estresse oxidativo foi avaliado pela concentração citosólica de TBARS e quantificação da atividade da enzima antioxidante SOD. Observamos aumento na lipoperoxidação nos animais PL. O DEN é hidrolisado em nitrosamina e gera radical etil, responsável pela intensificação do estresse oxidativo (Malik et al., 2013). Um dos fatores-chaves na formação do tumor é o desequilíbrio no estado redox, em favor a formação de produtos oxidantes, que podem atacar lipídios, proteínas e DNA (Mauriz et al., 2003; Vázquez-Garzón et al., 2013, Kretzmann et al., 2008). Neste estudo, a atividade da SOD foi reduzida em animais com CHC avançado, esta redução intensifica a progressão e piora da doença (Malik et al., 2013; Mauriz et al., 2007). Também avaliamos a expressão da proteína NQO1 que estava significativamente elevada no grupo CHC avançado. Muitos estudos referem que tumores sólidos expressam altos níveis de NQO1 (Ross et al., 1996). O gene de NQO1 é regulado tanto pelo elemento responsivo antioxidante (ARE), quanto pelo elemento responsivo xenobiótico (XRE) (Ross et al., 2000). Segundo Venugopal e Jaiswal (1996), o aumento na expressão NQO1 ocorre em resposta à geração de EAO ou à exposição de xenobiótico. As lesões pré-cancerosas mostraram atividade SOD aumentada, sem aumento na expressão da proteína NQO1. Sob condições de estresse oxidativo, os tecidos com altos níveis de SOD e baixa expressão NQO1 podem ter diminuição da depuração de ânion superóxido, gerando outras espécies reativas e piorando a lesão hepática (Dinkova-Kostova e Talalay, 2010).

As expressões de Keap1 e de Nrf2, também, foram avaliadas em animais com PL e CHC avançado. Em condições basais, Nrf2 é sequestrado no citoplasma pelo seu inibidor

Keap1, mas em condições de estresse oxidativo, o Nrf2 é capaz de se dissociar do Keap1, e se translocar para o núcleo, subsequentemente aumentando a expressão de genes antioxidante (Jeong, Jun, Kong, 2006). Observou-se que os animais em fase final de CHC mostraram aumento na expressão de Keap1 e redução na expressão de Nrf2 em comparação com os animais do grupo PL. (Jung e Kwak 2010). Não há dúvida quanto a dualidade do Nrf2, atuando como supressor ou como promotor do tumor (Sporn e Liby, 2012). Ativação deste fator facilita a citoproteção e contribui para a proliferação. Enquanto que sua inibição resulta em degradação (Kansanen et al., 2013, Linehan e Rouault 2013), favorecendo o aumento dos ataques das EAO à célula. O papel de Nrf2 é dependente da fase de carcinogênese. Na fase inflamatória, com lesões pré-cancerosas, aumenta a ativação de Nrf2 para reduzir o estresse oxidativo, contribuindo com a supressão do tumor (Satoh et al., 2013), porém, a manutenção da ativação do Nrf2, durante a progressão da carcinogênese, pode facilitar a transformação de nódulos displásicos em células cancerosas malignas, e torná-los resistentes ao tratamento (Satoh et al., 2013; Jaramillo, Zhang, 2013).

Outro achado interessante de nosso estudo foi a redução significativa na expressão de HSP70 no tecido hepático com CHC avançado. HSP70 tem funções citoprotetoras, atuam no dobramento de proteínas, transporte e degradação (Gupta et al., 2010). Rohde et al., (2005) relataram que HSP70 não é uma condição para o crescimento de células tumorais, mas desempenha um papel importante na manutenção do ciclo celular desregulado do tumor. Chuma et al., (2003) avaliaram a expressão de HSP70 no tecido do fígado com CHC e com nódulos pré-cancerosos, e observaram que HSP70 estava presente na fase inicial do CHC, concluindo que HSP70 poderia ser um marcador molecular da fase inicial do câncer hepático.

O Artigo 1 comprova que a indução do carcinoma hepatocelular em ratos é possível por meio da exposição crônica e intermitente de agentes carcinogênicos. Existem diferenças entre os estágios do CHC quanto o comportamento de proteínas envolvidas no estresse oxidativo e dano celular. As proteínas como TGF-1 β , Nrf2 e HSP70 estão mais expressas na fase inicial da doença e desempenham funções específicas neste processo. TGF-1 β estimula a formação da matriz extracelular e contribui para a proliferação celular. Enquanto que, a enzima SOD e o fator Nrf2 atuam como fatores citoprotetores em lesões pré-cancerosas. Já em CHC avançado, no entanto, há diminuição da expressão

de HSP70, e aumento na expressão da iNOS, que interagem com os genes importantes no controle do crescimento celular, apoptose e angiogênese.

Como conclusões do Experimento I, nossos resultados confirmam que o estresse oxidativo e a formação da fibrose desempenham papel importante na carcinogênese do fígado. Nossas evidências sugerem que, em um processo de múltiplos estágios estão envolvidos diferentes mecanismos moleculares que podem ser os responsáveis pela transformação da doença hepática crônica em CHC.

A segunda parte desta tese tem por objeto de estudo a ação da melatonina sobre a hepatocarcinogênese experimental. A melatonina é conhecida por apresentar propriedades oncostática, tais como: ação antiangiogênica, pró-apoptótica, antioxidantes e anti-inflamatória, além de modular as vias que controlam o ciclo celular. No entanto, os mecanismos que contribuem para os efeitos benéficos da melatonina sobre o CHC *in vivo* não são completamente compreendidos, por isso, avaliamos o papel da melatonina na regulação de vias moleculares relacionados à morte celular no CHC experimental.

Por isso, para o ***Experimento II*** foi novamente induzido ao CHC, agora somente o protocolo de DEN50, que desenvolve carcinoma hepatocelular avançado em 19 semanas. O objetivo foi estudar a ação da melatonina durante o processo de hepatocarcinogênese, avaliando o estresse oxidativo descrito no seguinte artigo: ***Melatonin attenuates oxidative damage in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats, submetido para Toxicologic Pathology.*** E avaliar o estresse de retículo endoplasmático e vias da apoptose nestes animais, publicado no artigo: ***Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis, aceito para publicação na PlosOne.***

O tratamento teve dois tempos: um com início na 5^a semana após o começo da indução com DEN (DEN+MEL5). Neste momento, existe a presença da inflamação hepática. O outro tempo, iniciou-se na 12^a semana, que coincide com o estabelecimento da cirrose hepática (DEN+MEL12).

Avaliou-se a eficácia e segurança do tratamento com melatonina em animais expostos ao DEN. Em geral, a melatonina melhorou a sobrevida global, padrão das enzimas hepáticas, a expressão do marcador de carcinoma hepatocelular, o aspecto

histológico e índice de dano do DNA do fígado em comparação com o placebo. Este estudo observou menor incidência de tumores em animais que foram tratados com Melatonina. Os animais do grupo DEN-CHC apresentaram pior prognóstico e maior gravidade em desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

No **Artigo 2** abordamos a capacidade da melatonina em proteger lipídios, proteínas e DNA de animais expostos à agentes carcinogênicos e a sua forte ação hepatoprotetora. Ao longo da carcinogênese o grupo DEN-CHC desenvolveu 90% de câncer hepático em 19 semanas, enquanto que animais tratados com melatonina demonstraram apenas 25% do CHC. DEN + 2-AAF são hepatocarcinogênicos poderosos (Williams et al., 1996). Enquanto, o DEN é hidrolisado em nitrosamina, gerando um radical eletrofílico; o 2-AAF forma adutos com DNA via citocromo P450 (CYP1A2) no fígado (Malik et al., 2013; Bagnyukova et al., 2008; Poirier, 2002) e inibe a proliferação de hepatócitos normais. No entanto, a melatonina atenuou a ação carcinogênica do DEN (Subramanian et al., 2007). Diversos estudos comprovaram a eficácia da melatonina para prevenir o desenvolvimento de câncer (Subramanian et al., 2007). Imaida et al., (2000) estudaram lesões pré-neoplásicas do fígado de ratos, induzidas por NDEA, observaram diminuição das lesões com o uso de melatonina. A inibição da síntese de melatonina, na estabilização da carcinogênese, acelera a transformação maligna e o crescimento celular, e isto resulta na menor sobrevivência dos ratos (Van den Heiligenberg et al., 1999). A melatonina desempenha ações oncostáticas: (a) por ação pró-apoptótica, sobre as células tumorais; (b) por suas ações antioxidantes (Tomas-Zapico e Coto-Montes, 2005) (c), por reforçar mecanismos imunes do organismo (Anisimov et al., 2006); (d) por reduzir a ativação de fatores-chave para o crescimento tumoral e sinalização de moléculas (por exemplo, ácido linoléico) (Blask et al., 2005). Animais do grupo DEN-CHC tiveram cerca de 30% de sobrevida após o uso do DEN, enquanto, que os animais DEN+MEL apresentaram 100% de sobrevida. Isto sugere que o tratamento com melatonina foi eficaz para amenizar os efeitos tóxicos e deletérios do DEN, e assim retardar o desenvolvimento de CHC experimental.

O uso da melatonina durante a indução do DEN evitou a morte dos animais em sua totalidade. Pela curva de sobrevivência Kaplan Meier pode-se perceber que animais que foram tratados com melatonina a sobrevida foi de 100% comparado aos 30% do grupo DEN-CHC (dado não apresentado). Para entender este achado, realizamos

inúmeros ensaios referentes ao índice de dano no DNA, as proteínas envolvidas no estresse oxidativo, ao estresse de retículo e as vias de apoptose.

Foi observado que a melatonina consegue restaurar a integridade das enzimas hepáticas, retornando a valores normais. Animais expostos ao DEN e tratados com melatonina reduziram significativamente os níveis de AST e ALT indicando efeito citoprotetor sobre os hepatócitos em acordo com Subramanian et al., 2007. O tratamento com a melatonina, também, foi eficiente na redução da reação ductular, da positividade da CK7 (pCK7) e dos níveis de γ GT, diminuindo o dano sobre o tecido biliar. O estudo histopatológico sinalizou CHC avançado nos animais que receberam apenas DEN. Enquanto que, animais tratados com melatonina obtiveram padrão histológico compatível com displasia de baixo grau e cirrose. Estes dados demonstram que a melatonina atuou como hepatoprotetora, atenuando a transformação do tecido hepático inflamado ou cirrótico em neoplásico.

Ao realizarmos o ensaio cometa foi possível avaliar que o DEN causou intenso índice de danos (DI) ao DNA, mais de 300 células de 400 avaliadas estavam com alterações. Entretanto, os animais DEN+melatonina apresentaram maior proteção a lesões no DNA. Salientamos que o grupo com Melatonina na 12^a semana demonstrou melhor resposta, obtendo DI igual aos controles. A melatonina exerce efeitos protetores e reparadores contra danos ao DNA. Liu et al., (2013) sugeriram que a melatonina pode participar na regulação de vários genes envolvidos no dano ao DNA e vias reparadoras, tais como CEP152 e N4BP2L2.

Para estudar ação da melatonina na carcinogênese hepática sobre o aspecto da inflamação, avaliamos a expressão das proteínas iNOS, eNOS, p65 e COX-2. Nestas análises podemos verificar que a melatonina atuou reduzindo a expressão da iNOS e aumentando a expressão da eNOS, revertendo a disfunção vascular presente nas doenças hepáticas crônicas. Assim como, atenuou significativamente a expressão de p65 e COX-2, reduzindo a inflamação, e evitando manter ativadas vias pró-tumorais (Figura 19). Regular a expressão de NF κ B permite atuar em inúmeras vias envolvidas na carcinogênese, dentre elas rotas proliferativas (via MAPK); angiogênica (via HIF/VEGF), inflamatória (via COX-2-iNOS). Novamente os melhores resultados ocorrem no grupo DEN+MEL12, comparado ao grupo DEN+MEL5.

A melatonina possui propriedades antioxidantes devido a dupla ligação existente na sua estrutura química, que lhe garante a capacidade de ceder elétrons a espécies químicas instáveis. Aspectos relevantes sobre este hormônio, é que seu pequeno peso molecular e sua característica anfipática, lhe permite livre trânsito pelas membranas e barreiras hematológicas. Reiter (2004) escreve sobre os mecanismos inibitório da Melatonina no câncer. Na fase de iniciação: ela limita a frequência de iniciação de câncer, reduzindo o dano ao DNA, pelo controle do estresse oxidativo. Na fase de promoção: ela atua sobre as vias de transdução de sinais, regulando a expressão gênica de fatores de crescimento e de diferenciação. Na fase de progressão: a melatonina controla o crescimento tumoral, atuando sobre o receptor do fator crescimento epidermal (rEGF).

Foi avaliada a lipoperoxidação (LPO) por meio da técnica da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizado de fígado. A LPO foi menor nos animais com câncer avançado (DEN-CHC) comparado aos animais com lesões pré-cancerosas (DEN+melatonina). Apesar deste resultado não ter sido esperado, existe uma explicação para o menor valor na oxidação dos lipídios no tecido neoplásico. As células tumorais exibem geralmente um baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana, que poderia justificar a reduzida sensibilidade à peroxidação lipídica (Poli et al., 1986; Dianzani et al., 1986; Masotti et al., 1988; Canuto et al., 1991).

Estudos que avaliaram a quantidade de ácidos graxos nas células de tecido tumoral, verificaram redução na quantidade de lipídios. A falta de substrato seria uma causa relevante para a diminuição da peroxidação lipídica em hepatócitos tumorais. A desestruturação e a perda dos lipídios podem estar associada à progressão da doença neoplásica e à redução da LPO (Figura 18a) (Poli et al., 1986; Dianzani et al., 1986; Masotti et al., 1988; Canuto et al., 1991). Além de contribuir para o aumento do dano oxidativo à proteínas e DNA.

Isto se comprova quando avaliadas as proteínas carboniladas e o índice de dano ao DNA de animais com CHC avançado, e se verifica intensa oxidação proteica e maior número de células danificadas (Poli et al., 1986; Dianzani et al., 1986; Masotti et al., 1988; Canuto et al., 1991).

A melatonina atuou protegendo as macromoléculas - lipídeo, proteína e DNA contra as EAO (Figura 18b). Observamos que animais com DEN+melatonina tiveram

maior LPO, sinalizando a existência de substrato lipídico, porém a oxidação proteica e danos ao DNA reduziram consideravelmente.

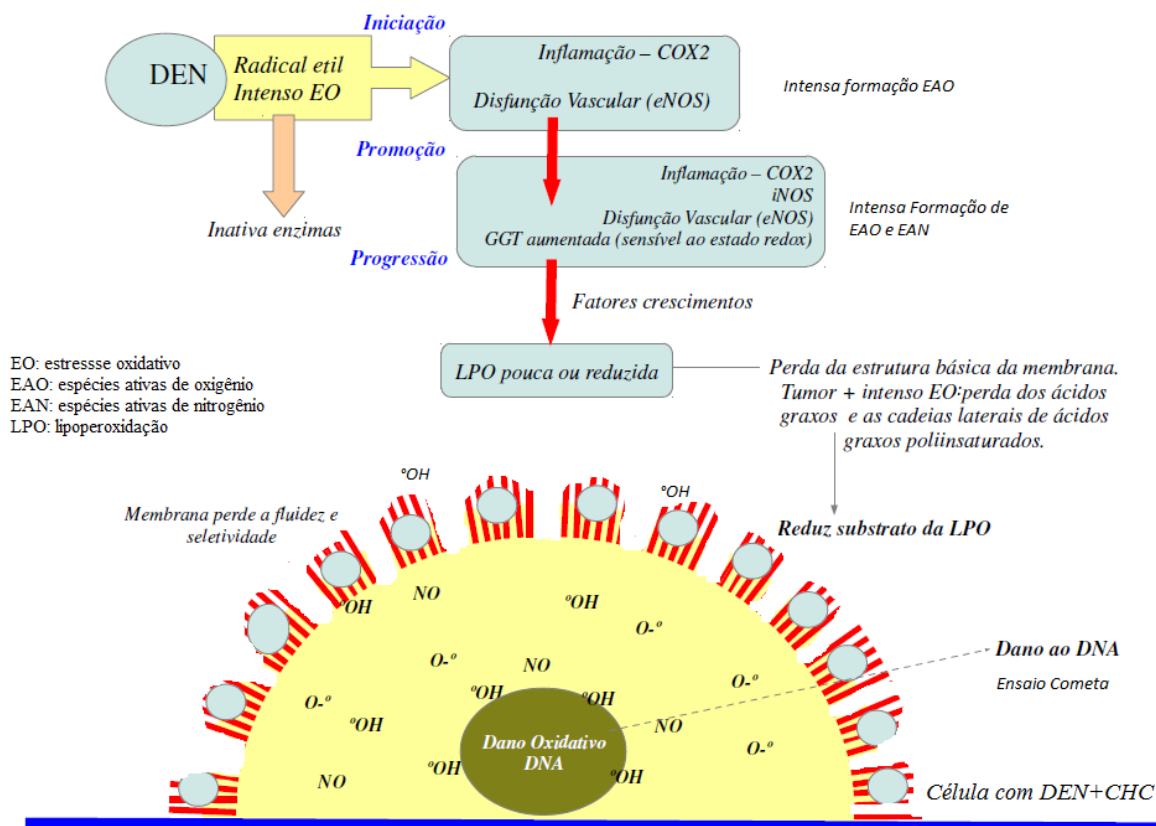


Figura 18a: Modelo esquemático da ação das espécies ativas de oxigênio sobre os lipídios, proteínas e DNA sob condições de hepatocarcinogênese sem a presença de Melatonina. Percebe-se mais dano inflamatório, disfunção vascular, maior dano ao DNA e menor valor de LPO, devido a perda de substrato.

As proteínas avaliadas para se estudar o sistema oxidativo foram Keap1, Nrf2, NQO1. Observamos que animais com CHC avançado (grupo DEN-CHC) apresentavam mais expressão do inibidor Keap1 e menor ativação do fator Nrf2. Já, os animais DEN+melatonina exibiram um padrão de menor expressão do inibidor citoplasmático Keap1 e maior expressão do fator Nrf2. Isto pode sugerir que o sistema citoprotetor foi acionado nestas condições. Como consequência, os animais DEN+melatonina tinham maior atividade da SOD em comparação aos animais DEN-CHC. A melatonina é considerada um potente *scavenger*, e atua de forma sinérgica, estimulando o sistema enzimático antioxidante, reforçando o efeito citoprotetor. (Reiter 2004). Fato interessante

que foi registrado neste estudo se refere ao aumento na expressão de NQO1 nos animais com tumores avançados. Existem duas explicações, a primeira está associada a presença do tumor e a outra ligada ao xenobiótico. É relatado que em condições basais, a expressão de NQO1 é extremamente baixa, porém na presença de tumores sólidos, sua expressão é estimulada. A outra explicação pode estar ligada ao xenobiótico usado, que foi capaz de ativar o elemento responsivo a xenobiótico, que também regula a expressão desta enzima.

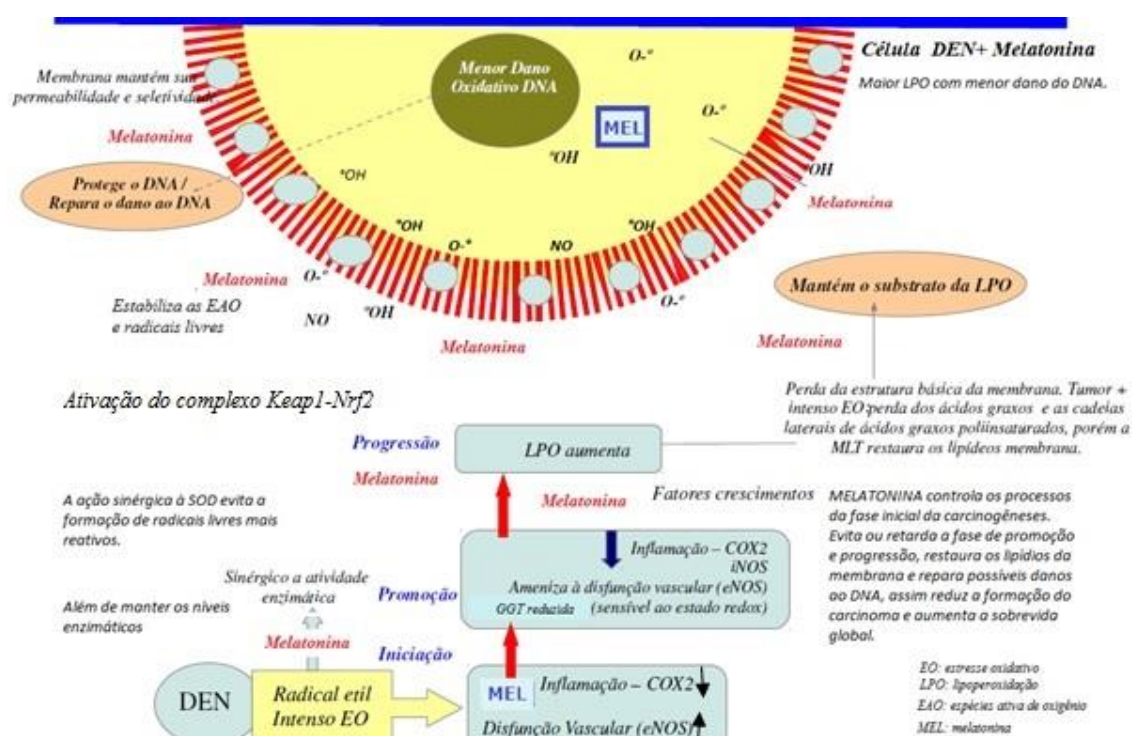


Figura 18b: Modelo esquemático da ação das espécies ativas de oxigênio sobre os lipídios, proteínas e DNA sob condições de hepatocarcinogênese com a presença de Melatonina. Reduz a inflamação e aumenta a ação do sistema antioxidante, protege o DNA e mantém os componentes lipídicos.

Por fim, o **Artigo 2** fornece evidências concretas que fundamentam a ação hepatoprotetora da melatonina quanto ao dano oxidativo. Neste artigo foi demonstrado que os fígados dos animais DEN+melatonina atenuaram o estresse oxidativo e as características hepatocarcinogênicas primárias, visto pela melhora no aspecto histológico, reduzida atividade das enzimas hepáticas, menor resposta inflamatória e menor índice de dano no DNA.

O **Artigo 3** explora a ação da melatonina sobre o estresse de retículo e apoptose durante à carcinogênese. Para confirmar a indução de carcinoma hepatocelular foi

avaliada a expressão da proteína Glutathione S Transferase Placentária (GST-P) em homogeneizados de tecido do fígado. GST-P tem sido utilizada como marcador de CHC, cuja expressão é reprimida em fígados normais. Animais CHC aumentaram significativamente os níveis de GST-P. Todas estas descobertas estão em conformidade com os resultados de outros grupos que também utilizaram DEN como promotor de câncer em ratos.

As propriedades antioncogênicas de melatonina foram testadas em diferentes tipos de câncer, incluindo de mama, melanoma, neuroblastoma ou de próstata (Cutando et al., 2012). A maioria dos estudos sobre CHC foram realizados em células cultivadas de hepatoma, em que a melatonina modula a apoptose, inibe a expressão de genes angiogênicos e reduz a migração e mobilidade das células HepG2 durante a metástase, sem efeitos tóxicos sobre hepatócitos saudáveis (Martin-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2011; Carbajo-Pescador et al. 2013; Carbajo-Pescador et al., 2013a; Ordonez et al., 2014). A melatonina tem sido relatada como agente ativo na restauração da atividade antioxidante e bioquímica do fígado (Subramanian et al., 2007) e na redução das lesões neoplásicas e expressão GST-P em animais submetidos à carcinogênese hepática (Rahman et al., 2003). No entanto, os efeitos da melatonina, no modelo DEN estão focados principalmente no seu impacto sobre a maquinaria antioxidante, poucos trabalhos estudam os mecanismos moleculares que já foram observados *in vitro*, por isso são necessárias evidências *in vivo*, que confirmem as observações feitas em cultura células, para que assim possam ser definidas metas eficazes para o tratamento do CHC. (Hadem et al., 2014; Balamurugan et al., 2012; Jayakumar et al., 2012).

No câncer, existem inúmeros eventos que difere do funcionamento normal da célula, destacamos neste estudo o estresse de retículo endoplasmático e a supressão da apoptose. O retículo endoplasmático (RE) é uma organela envolvida na dobragem e transporte de proteínas e na biossíntese de lípidos. Se as células são expostas a situações estressantes, RE inicia uma resposta para manter a integridade celular (UPR), mas em determinadas situações esta resposta aciona a morte da célula (Yadav et al., 2014). O efeito da melatonina sobre o estresse de RE foi avaliado nos animais expostos à carcinogênese, por meio das expressões de proteínas como BiP, ATF6 e CHOP. BiP é responsável pela correta dobragem de proteínas clientes no lúmen do RE (Yoshida et al., 2001). A BiP está na superfície da membrana ligada a 3 estruturas PERK/ IRE1 e ATF6.

Quando em condições de sobrecarga na síntese proteica, o RE entra em estresse, não conseguindo desempenhar suas funções de dobragem e transporte de proteínas recém-formadas. Nossos resultados mostraram que a expressão de BiP se encontrava aumentada em ratos tratados com DEN que receberam melatonina, indicando que este hormônio foi capaz de iniciar a resposta estresse de RE. O RE em estresse permite a liberação de BiP do fator ATF6. ATF6_{90p} é um fator sensível ao estresse de RE, esta proteína se cliva na porção 50kDa. O fragmento do ATF6_{50p} é a forma ativa, que promove a transcrição dos genes de chaperonas e CHOP (Adachi et al., 2008). CHOP é um modulador da apoptose, que aumenta a expressão de proteínas pró-apoptóticas e, regula negativamente genes anti-apoptóticos (McCullough et al., 2001; Puthalakath et al., 2007; Yamaguchi e Wang, 2004). Esta proteína visa controlar o estresse de RE e acionar vias apoptóticas para evitar proteínas mal dobradas ou de baixa qualidade (Williams e Lipkin, 2006). Nossas observações permitem concluir que a melatonina aumenta a expressão de ATF6 clivada e CHOP em ratos com DEN-CHC. Isto sugere que o estresse RE poderia ser responsável, em parte, para a regulação da apoptose em nosso modelo.

Então, decidimos avaliar o efeito da melatonina sobre o estado apoptótico em ratos tratados com DEN. Caspase 3 é o principal executor da apoptose e, sua ativação resulta em proteólise de PARP (Mauriz et al., 2008). Nossos dados indicam que a melatonina aumentou a clivagem de PARP e a atividade da caspase 3, confirmando seu efeito pró-apoptótico. Estes resultados estão de acordo com estudos em células HepG2, que foram utilizadas doses suprafisiológicas de melatonina e, observaram indução na ativação da apoptose e morte celular (Martin-Renedo et al., 2008). Outro estudo, combinando a melatonina com agentes quimioterapêuticos, tais como sorafenib (Fan et al., 2010; Gao et al., 2012), também foi observado o aumento na apoptose em células de hepatoma. Outros antioxidantes também demonstraram propriedades pró-apoptóticas em CHC induzidos por DEN, como a curcumina que aumentou a liberação do citocromo c e a fragmentação do DNA em relação ao grupo controle (Ghosh et al., 2012).

Para elucidar o possível mecanismo pró-apoptótico de melatonina na hepatocarcinogênese, avaliamos o estado das vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas. A via intrínseca é frequentemente anormal no câncer, prova disto é a expressão anômala das proteínas da família Bcl-2 em linhagem de células de câncer humano (Delbridge e Strasser, 2015). Nosso estudo, observou que os níveis da proteína Bax encontravam-se aumentados em animais que receberam DEN+melatonina. Sabe-se que o Bax é inativado

em tumores sólidos (Rampino et al., 1997), de modo que a restauração da sua funcionalidade pode levar à regressão de CHC. Bcl-2, a principal proteína anti-apoptótica, tem a capacidade de inibir a ação da Bax. Por isso a relação entre ambas foi analisada. A razão Bax/ Bcl-2 foi maior nos grupos que receberam melatonina em comparação com animais tratados apenas com DEN. Este efeito correlacionado com a libertação de citocromo c das mitocôndrias, indicam que a regulação da via mitocondrial, pode contribuir para os efeitos pró-apoptóticos da melatonina.

Buscando mais evidências que suportem nossa tese, avaliamos o p53, que é um fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos na apoptose, tais como Bax ou Bcl-2 (Hickman et al., 2002) Verificamos que nos grupos DEN+melatonina, o p53 encontrava-se mais expresso no tecido hepático comparado aos animais DEN, o que sugere que esta proteína pode estar envolvida na regulação dos marcadores apoptóticos intrínsecos pela melatonina.

Devido ao fato que a melatonina também ativa a via extrínseca da apoptose em células HepG2 (Martin-Renedo et al., 2008) avaliou-se a atividade da caspase 8, que é responsável por ativar a via do receptor de morte da apoptose, por meio da ligação de Fas e Fas-L, a qual induz a formação de complexa sinalização de morte-induzida. A atividade da Caspase 8 e a expressão de Fas-L foram induzidas após tratamento com a melatonina, indicando um possível envolvimento da via extrínseca nos efeitos pró-apoptóticos promovido por esta indolamina.

Os nossos resultados demonstram que o uso do DEN causou aumento na expressão de COX-2, enquanto os animais com DEN mais a administração de melatonina resultaram em restauração dos níveis normais. Recentemente, foi relatado mecanismo pelo qual a melatonina sensibiliza células de hepatoma humano pelo retículo endoplasmático e, induz a apoptose por reduzir a expressão COX-2, aumentando os níveis de CHOP e diminuindo a razão Bcl-2/ Bax (Zha et al., 2012). Nossos resultados constataram que este sistema de controle e qualidade celular está inativo nos animais com CHC avançado. E que, a melatonina é eficaz de acionar as proteínas do estresse de RE e ativar as repostas extrínsecas e intrínsecas da apoptose, assim atenuando a formação do CHC.

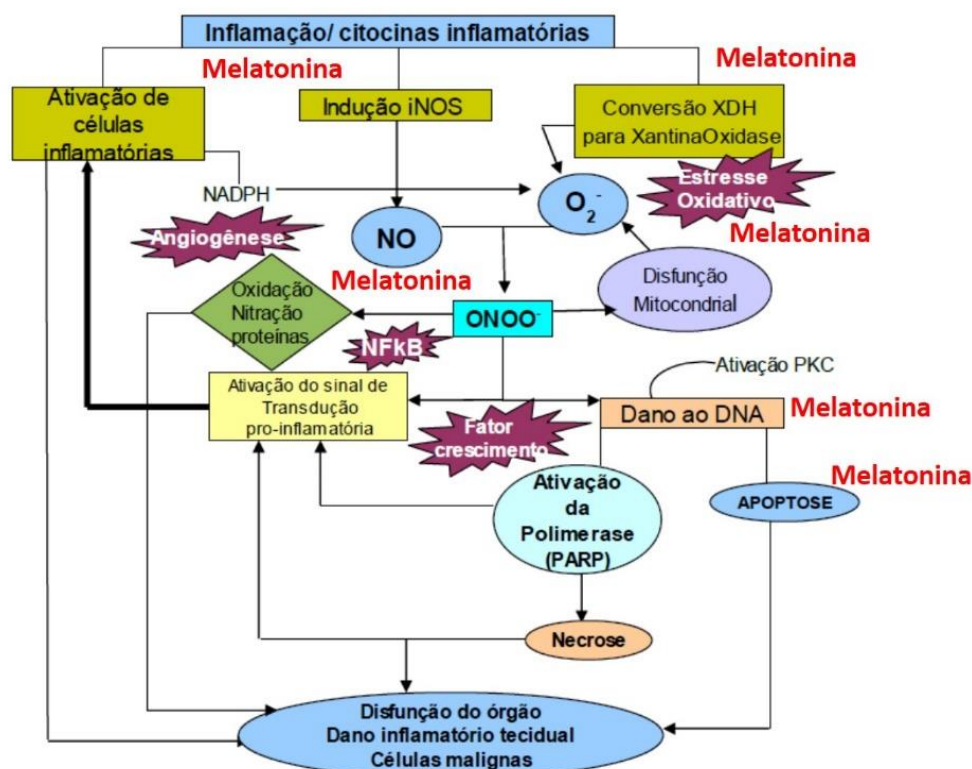


Figura 19: O esquema descreve as interações entre as respostas ao estresse oxidativo, ao fator nuclear kB, a ativação de rotas inflamatórias e apoptose envolvidas na transformação da doença crônica hepática em alterações celulares malignas e a ação regulatória da Melatonina sobre este processo.

A administração da melatonina iniciou nas semanas 5 e 12, depois do início da administração DEN, para avaliar os efeitos desta indolamina em diferentes graus de dano hepático. No início do tratamento, os animais na 5ª semana apresentavam quadro de inflamação, enquanto que os, da 12ª semana se encontravam cirróticos. Apesar de não terem sido observadas, na maioria dos marcadores de apoptose, diferenças significativas entre os dois tempos de tratamento com a melatonina, a expressão de GST-P foi notavelmente mais baixa no grupo com a administração de melatonina durante o estabelecimento da cirrose. De forma semelhante, observou-se que, embora o estresse de RE tenha sido ativado nos dois grupos que receberam DEN+melatonina, a administração da indolamina no estado de cirrose resultou em uma maior capacidade de indução de ATF6 e CHOP, isto sugere que a melatonina pode ter efeitos diferentes em vias moleculares, dependendo do grau de lesão hepática, e mais estudos são necessários para elucidar este processo.

Nossa pesquisa demonstrou que a melatonina administrada durante inflamação ou na fase cirrótica da hepatocarcinogênese age como agente pró-apoptótico, capaz de melhorar a histologia e os resultados bioquímicos em CHC induzida por DEN. Além disso, a melatonina também induz a resposta ao estresse RE que poderia estar ligado aos efeitos apoptóticos observados. No entanto, é necessário determinar as vias de sinalização que regulam ambos os processos, com o objetivo de potencializar as aplicações terapêuticas da melatonina no tratamento de CHC.

Conclusão

CONCLUSÃO

Esta tese estudou a carcinogênese hepática experimental em três momentos: no desenvolvimento do modelo experimental, na comparação entre lesões iniciais e lesões avançadas e na intervenção da melatonina sobre a carcinogênese. Como conclusões gerais seguem:

▪ Experimento I:

Determinamos o modelo experimental de carcinogênese hepática em 19 semanas por meio de um protocolo de exposição crônica e intermitente de agente carcinogênico, estabelecemos janelas terapêuticas que permitem intervir com propostas terapêuticas, além de atender a todos os quesitos necessários recomendados para ser um modelo experimental de CHC.

Observamos diferenças entre as lesões pré-cancerosas com carcinoma avançado quanto aos aspectos bioquímicos, histológicos e de estresse oxidativo. Na fase inicial existe mais lipoperoxidação, enquanto que na fase mais tardia do carcinoma, a lipoperoxidação é menor, porém, fatores nucleares e as rotas pró-tumorais já estão acionadas.

▪ Experimento II:

Estudamos o efeito da administração da Melatonina durante a hepatocarcinogênese experimental sobre o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e apoptose, e concluímos que a Melatonina é capaz de controlar a formação do tumor. Ela atuou como potente antioxidante, ativou as proteínas envolvidas no estresse de retículo endoplasmático e assim, acionou o sistema de apoptose intrínseco e extrínseco, controlando as fases de promoção e progressão tumoral.

Conclusões por artigos

No *Experimento I* ao determinar o modelo experimental de Carcinoma Hepatocelular e comparar lesões pré-cancerosas (PL) com CHC avançado concluímos que:

1. ***Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats, (Toxicology Reports 2 (2015) 333–340).*** Neste artigo são respondidos os seguintes objetivos:

Descrever as etapas do desenho experimental para estabelecimento da carcinogênese por indução química em ratos.

O modelo crônico e intermitente de exposição ao DEN50+2-AAF desenvolve CHC em 19 semanas em ratos machos e jovens, e é possível definir a fase inflamatória (5^a semana); a fase cirrótica (10-12^a semana); CHC (a partir da 17^a semana). Já, DEN100+2-AAF apresentou ao final de 28 semanas lesões pré-cancerosas.

Caracterizar as manifestações do aspecto geral e somático: avaliar aspectos gerais: peso, relação hepatossomática, avaliando nódulos e massas tumorais.

Os animais DEN50 perdem peso, desenvolvem nódulos grandes, compatíveis com CHC avançado a partir da 17^a semana. Os animais DEN100 não se observou perda no peso, nem alteração na relação hepatossomática, pois seus nódulo eram pequenos.

Avaliar aspectos histológicos em animais com lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.

A histologia do DEN50 foi caracterizada por alterações clássicas encontradas em CHC avançado, tais como padrão pseudoacinar e trabecular, alterações de atipia celular, aumento na densidade celular. Enquanto que o padrão histológico do DEN100 foi lesões pré-cancerosas, nódulos displásicos e displasia de baixo grau. Os animais com CHC exibiram mais depósito de colágeno que os animais com lesões pré-cancerosas.

Quantificar as enzimas de integridade hepática dos animais com lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.

Animais com CHC avançado e PL tiveram alterações nas enzimas de integridade hepáticas, sendo que os animais com CHC apresentaram elevados níveis γ GT.

Determinar o envolvimento do óxido nítrico (NO) em lesões pré-cancerosas e CHC avançado.

Animais com CHC avançado apresentaram mais expressão de iNOS e redução na eNOS, quando comparada às lesões iniciais. Este dado destacou a importância da disfunção vascular presente na doença hepática, no processo de transformação do estágio pré-canceroso para o estágio de malignidade.

Determinar o estresse oxidativo em lesões pré-cancerosas (PL) e CHC avançado.

As lesões pré-cancerosas exibiram mais LPO, ativaram o complexo Keap1-Nrf2 e apresentaram mais atividade da SOD. Entretanto, o CHC avançado apresentou baixos níveis de LPO e SOD, assim como não ativou o sistema Keap1-Nrf2.

2. *Melatonin attenuates oxidative damage in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats*, (submetido para Toxicologic Pathology). Este artigo responde os seguintes objetivos específicos do Experimento II:

Avaliar a relação hepatossomática dos animais submetidos à carcinogênese com e sem Melatonina.

A Melatonina controlou a carcinogênese hepática observada pela redução na quantidade e tamanho dos nódulos tumorais, mantendo a relação hepatossomática destes animais. A Melatonina aumentou a sobrevivência dos animais submetidos à carcinogênese.

Avaliar as enzimas de integridade hepática dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

A Melatonina foi capaz de restaurar os valores das enzimas hepáticas (AST, ALT, FA e γ GT) dos animais submetidos à carcinogênese.

Avaliar os aspectos macroscópicos e histológicos do fígado dos animais submetidos à carcinogênese com ou sem Melatonina.

Os animais com CHC desenvolveram nódulos grandes, enquanto que os animais que recebem melatonina apresentaram fígados cirróticos. Os animais tratados com a Melatonina apresentaram aspecto histológico compatível com lesões pré-cancerosas e cirrose, diferentemente dos não tratados que desenvolveram CHC avançado com atipias celulares.

Determinar a reação ductular de animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;

Os animais com CHC avançado desenvolveram extensa área de reação ductular, porém aqueles tratados com Melatonina, a reação ductular foi menor com menos

positividade para CK7. Novamente, a Melatonina demonstrou ser hepatoprotetora frente a agentes carcinogênicos.

Determinar o dano ao DNA (mutagenicidade) do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;

A Melatonina foi capaz de reduzir os danos ao DNA de fígado de animais submetidos a agentes carcinogênicos.

Determinar o estresse oxidativo do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

Animais com CHC exibiram menor LPO, comparados aos tratados. Animais tratados com Melatonina acionaram o complexo Keap1-Nrf2, estimularam a atividade da SOD, reduzindo o dano oxidativo proteico e dano ao DNA. Ao contrário, os animais CHC avançado não acionaram o sistema citoprotetor Keap1-Nrf2, apresentaram redução da atividade da SOD e maior oxidação proteica e dano ao DNA.

Determinar expressão de fator nuclear κ B do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina.

A Melatonina exerceu ação anti-inflamatória, atuando sobre a regulação do fator nuclear κ B tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese. A ação reguladora da Melatonina sobre este fator, auxilia no controle de inúmeras rotas pró-tumorais.

3. *Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis, aceito para publicação na PlosOne.* Este artigo responde os seguintes objetivos específicos do Experimento II:

Determinar a expressão do marcador tumoral GST-P do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina

Os animais com CHC avançado apresentaram forte expressão do marcador tumoral GST-P do tecido hepático, porém os animais tratados com Melatonina, tiveram atenuação deste marcador.

Determinar expressão de COX-2 do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese com e sem tratamento com Melatonina;

A Melatonina exerceu ação anti-inflamatória, atenuando a expressão da COX-2 do tecido hepático dos animais submetidos à carcinogênese.

Comprovar o efeito da Melatonina sobre o estresse de retículo e a apoptose na carcinogênese hepática.

A Melatonina atuou sobre as proteínas envolvidas no estresse de retículo (ATF6, BiP e CHOP/GADD), assim desencadearam a ativação das vias de apoptose. Observamos aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas (Fas, Bax, TRAIL) e redução da expressão das anti-apoptóticas (Bcl2, Bclx/L). Isto contribuiu para evitar a fase de progressão do tumor nos animais tratados com Melatonina.

Por fim, podemos sugerir que a Melatonina atuou como antioxidante, anti-inflamatório e anti-apoptótico. Estes efeitos durante a carcinogênese hepática comprovou que a Melatonina apresenta propriedades oncostáticas, capazes de atenuar o desenvolvimento do tumor hepático. De forma que ela controla a fase de iniciação, e evita a fase de promoção e de progressão tumoral.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, Y, Yamamoto, K, Okada, T, Yoshida, H, Harada, A, Mori, K. (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* 33:75-89.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX et al. (2003) The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 34:1–10.
- Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA et al. (2006) Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 1757:573–589.
- AVMA (2013). AVMA Guidelines for the Euthanasia of animals: 2013 edition pp. 1-102.
- Baeuerle, P.A.; Henkel, T. (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Ver. Immunol.* 12; 141-179.
- Bagnyukova, T. V., Tryndyak, V. P., Montgomery, B., Churchwell, M. I., Karpf, A. R., James, S. R., Muskhelishvili, L., Beland, F. A., and Pogribny, I. P. (2008). Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* 29, 638-46.
- Bakkar N, Guttridge DC (2010). NF- B Signaling: A Tale of Two Pathways in Skeletal Myogenesis. *Physiol Rev.* 90:495–511.
- Balamurugan, K, Karthikeyan, J. (2012) Evaluation of Luteolin in the Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced Hepatocellular Carcinoma Using Animal Model System. *Indian J Clin Biochem.* 27:157-63.
- Barp, J; Araujo, A; Fernandes, T; Rigatto, K; LLesuy, S; Belló-Klein, A; Singal, P (2002) Myocardial antioxidante and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res.* 35, 1075-81.
- Bejarano, I, Espino, J, Marchena, AM, et al. (2011) Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol Cell Biochem.* 353:167-76.
- Berlett BS, Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272 (33) 20313-6.
- Binoto M., Krueel Schmidt M., Silveira Volkweis B., Behrend Silva Ribeiro G., Isabel Edelweiss M., Ricachenevsky Gurski R. (2008) Mouse model of diethylnitrosamine-induced gastric cancer. *J. Surg. Res.* 148(2), 152–157.

- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. (2005) Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 27:179–188.
- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. (2002) Melatonin as a chronobiotic/ anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadianbased cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2:113–132.
- Bolondi L. (2003) Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol.* 39:1076–84.
- Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, et al. (2012) Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol.* 762920.
- Boonjaraspinyo, S, Boonmars, T, Kaewkes, S, Laummaunwai, P, Pinlaor, S, Loilome W, Yongvanit, P, et al. (2012) Down-regulated expression of HSP70 in correlation with clinicopathology of cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* 18: 227-37.
- Boonstra J, Post JA. (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337:1-13.
- Bours, V; Burd, P.R.; Brown, K.; Villalobos, J.; Parks, S. et al. (1992) A novel mitogeninducible gene product related to p50-p105-NF-kB participates in transactivation through a kB site. *Mod. Cell. Biol.* 12:685-695.
- Boveris, A., Chance, B., (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* v. 134, p. 707-716.
- Boyce, M. et al. (2005) A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935–939.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Bruix J; Han, K; Gores, G., Llovet J, Mazzaferro, V. (2015) Liver cancer: Approaching a personalized care. *Journal of Hepatology* vol. 62 j S144–S156.
- Bruix, J, Boix L, Sala M, and Llovet, J (2004) Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell* march, vol 5: 215-219.
- Bruix, J, Raoul, J, Sherman, M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, Galle P, Santoro A, el Beaugrand M, Sangiovanni A, Porta C, Gerken G, Marrero J, Nadel A,

- Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Llovet J, (2012) Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Subanalyses of a phase III trial *Journal of Hepatology* vol. 57 j 821–829
- Bruix, J., and Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53(3), 1020-2.
- Brzezinski A. (1997) Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 336:186–195.
- Buege, J.A; Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* V52, 302-309.
- Canuto, R et al (1991) Lipid Peroxidation in Rat AH-130 Hepatoma Cells Enriched in Vitro with Arachidonic Acid. *Cancer Research.* September 51 (1), 4603-4608.
- Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, Galle PR, Gonzalez-Gallego J, Strand S (2013) Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer* 108: 442–449.
- Carbajo-Pescador, S, Ordonez, R, Benet, M, et al. (2013a) Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1alpha and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *Br J Cancer* 109: 83-91.
- Carbajo-Pescador, S; Garcia-Palomo, A; Martin-Renedo, J; Piva, M; Gonzalez-Gallego, J; Mauriz, JL (2011). Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor, *J. Pineal Res.* 51: 463-471.
- Chance, B; Sies, H; Boveries, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Res.* 59, 527-605.
- Cheeseman K H, Slater T F. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman K H, Slater T F, (eds). *Free Radical in Medicine.* NewYork: Churchill Livingstone; 1993. pp. 481-93.
- Chen B., Liu L., Castonguay A., Maronpot R.R., Anderson M.W., You M. (1993) Dose-dependent Ras mutation spectra in N-nitrosodiethylamine induced mouse-liver tumors and 4- (methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanone induced mouse lung-tumors. *Carcinogenesis* 14, 1603–1608.
- Chen W; Zhu, G; Pfaffenbach, K; Kanel, G; Stiles, B; Lee, A. (2014) GRP78 as a regulator of liver steatosis and cancer progression mediated by loss of the tumor suppressor PTEN *Oncogene.* October 16; 33(42): 4997–5005.

- Chuma, M, Sakamoto, M, Yamazaki, K, Ohta, T, Ohki, M, Asaka, M, Hirohashi, S (2003) Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 37, 198–207.
- Chuma, M, Sakamoto, N, Nakai, N, Hige, S, Nakanishi, M, Natsuzaka, M, Suda, G et al. (2014) Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis* 35: 272–281.
- Cipolla-Neto, J.; Afeche, S C. Glândula Pineal. In Aires, MM. Fisiologia, 3 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008, pp 981-990.
- Csórdas, G e Hajnoczky G; (2009) SR/ER-mitochondrial local communication: Calcium and ROS *Biochim Biophys Acta*. November; 1787(11): 1352–1362.
- Cutando, A, Lopez-Valverde, A, Arias-Santiago, S, Dev, R G, (2012) Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res.* 32:2747-53.
- Cuzzocrea, S; Reiter R; (2002) Pharmacological Actions of Melatonin in Acute and Chronic Inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* Feb; 2 (2):153-65.
- Decker, NK, Abdelmoneim, SS, Yaqoob, U, Hendrickson, H, Hormes, J, Bentley, M, Pitot, H, Urrutia, R, Gores, G, Shah, V. (2008) Nitric oxideregulates tumor cell cross-talk with stromal cells in the tumormicroenvironment of the liver, *Am. J. Pathol.* 173, 1002–1012.
- Delbridge, AR, Strasser, A. (2015) The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 22: 1071-80.
- Denk H. (1984) The intermediate filament cytoskeleton in neoplastic and non-neoplastic liver disorders. *J. Submicrosc Cytol.* 16: 141–145.
- Desmet V. (2011) Ductal plates in hepatic ductular reactions. *Virchows Arch.* 458: 251-259.
- Dianzani, M. U., Poli, G., Canuto, R. A., Rossi, M. A., Biocca, M. E., Biasi, F., Cecchini, G., Muzio, G., Ferro, M., and Esterbauer, H. (1986) New data on kinetics of lipid peroxidation in experimental hepatomas and preneoplastic nodules. *Toxicol. Pathol.* 74:404-410.
- Dinkova-Kostova, A, Talalay, P (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme andexceptionally versatile cytoprotector, *Arch. Biochem. Biophys.* 501 116–123.

- Dröge W, (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol Rev* 82: 47–95.
- El Mesallamy, H, Metwally, N, Soliman, MS, Ahmed, K, Moaty, MM. (2011) The chemopreventive effect of Ginkgo biloba and Silybum marianum extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell Int.* 11: 38.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol.* Jun;35(4):495-516.
- Escames, G; Acuna-Castroviejo D; Lopez L C; Tan D; Maldonado M D; Sánchez-Hidalgo M; León, J.; Reitee, R J (2006) Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol.* Sep; 58(9):1153-65.
- Fan, LL, Sun, GP, Wei, W, et al. (2010) Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 16:1473-81.
- Farber, E., Solt, D., Cameron, R., Laishes, B., Ogawa, K., and Medline, A. (1977). Newer insights into the pathogenesis of liver cancer. *Am J Pathol.* 89, 477-82.
- Farriol M, Venereo Y, Orta X et al. (2000) In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J Appl Toxicol.* 20:21–24.
- Fausto N, Campbell J, (2010) Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma. *Seminars in Liver Disease* vol 30, (1), 87-96.
- Favier, A.E.; Cadet, J.; Kalyanaraman, B.; Fontecave, M.; Pierre, J.L. (1995) Analysis of free radicals in biological systems. *Basel, Boston, Berlin, Birkhauser.*
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010a) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46:765–781.
- Ferlay, J, Shin, H.R., Bray, F, Forman, D, Mathers, C, Parkin, DM. (2010b) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int.J. Cancer* 127 2893–2917.
- Finnberg N., Stenius U., Hogberg J. (2004) Heterozygous p53-deficient (+/-) mice develop fewer p53-negative preneoplastic focal liver lesions in response to treatment with diethylnitrosamine than do wild-type (+/+) mice. *Cancer Lett.* 207, 149– 155.

- Frau, M, Biasi, F, Feo, F, Pascale, RM (2010) Prognostic markers and putative therapeutic targets for hepatocellular carcinoma, *Mol. Aspects Med.* 31, 179–193.
- Frey S., Buchmann A., Bursch W., Schulte-Hermann R., Schwarz M. (2000) Suppression of apoptosis in C3H mouse liver tumors by activated Ha-ras oncogene. *Carcinogenesis* 21, 161–166.
- Gao, Y, Li, HX, Xu, LT, et al. (2012) Bufalin enhances the anti-proliferative effect of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cells through downregulation of ERK. *Mol Biol Rep.* 39:1683-9.
- Ghosh, D, Choudhury, ST, Ghosh, S, et al. (2012) Nanocapsulated curcumin: oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *Chem Biol Interact.* 195:206-14.
- Goldin JR, Raymundo MM. (1997). Pesquisa em Saude e os Direitos dos Animais. 2ª ed. Porto Alegre: HCPA.
- Gould, VE. (1986) Histogenesis and differentiation: a re-evaluation of these concepts as criteria for the classification of tumors. *Hum Pathol.* 17: 212-5.
- Gressner, O; Weiskirchen, R; Gressner, A (2007). Biomarkers of liverfibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests, *Clin. Chim. Acta* 381 107–113.
- Guiu, B, Deschamps, F, Boulin, M, Boige, V, Malka, D, Ducreux, M, Hillon, P, de Baère, T. (2012) Serum gamma glutamyl transferase independently predicts outcome after transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: external validation. *Cardiovasc Intervent Radiol* 35, 1102-8.
- Gupta, S, Deepti, A, Deegan, S, Lisbona, F, Hetz, C, Samali, A (2010) HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1 alpha-XBP1 signaling through a physical interaction, *PLoS Biol.* 8 e1000410.
- Hacker HJ, Mtiro H, Bannasch P, Vesselinovitch SD. (1991) Histochemical profile of mouse hepatocellular adenomas and carcinomas induced by a single dose of diethylnitrosamine. *Cancer Res.* 51(7):1952–1958.
- Hadem, KL, Sharan, RN, Kma, L. (2014) Inhibitory potential of methanolic extracts of *Aristolochia tagala* and *Curcuma caesia* on hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in BALB/c mice. *J Carcinog.* 13:7.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1989) Free Radical Bio Med, second edition, Oxford, Clarendon Press.

- Hanahan, D, and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer review. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D, and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-74.
- Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V. (1999) Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* 20: 553-9.
- Hardeland R. (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 27:119-130.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, et al. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18:45–51.
- Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. (2009) Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol*. 90 (4):367–386.
- Henle ES, Linn S. (1997) Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/ hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 272 (31)19095-8.
- Hickman, ES, Moroni, MC, Helin, K. (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 12:60-6.
- Hill SM, Blask DE. (1988) Effects of the pineal hormone melatonina on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res*. 48:6121–6126.
- Hotamisligil, G (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, March 19; 140(6): 900–917.
- Hulley, S; Cummings, S; Browner, W; Grady, D; Hearst, N; Newman, T. (2006) Delineando a pesquisa clinica: uma abordagem epidemiologica. 2ª edição, Porto Alegre, Artmed.
- Imaida K, Hagiwara A, Yoshino H et al. (2000) Inhibitory effects of low doses of melatonin on induction of preneoplastic liver lesions in a medium-term liver bioassay in F344 rats: relation to the influence of electromagnetic near field exposure. *Cancer Lett*; 155:105–114.
- Isler JA, Skalet AH, Alwine JC (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* 79: 6890–6899.

- Jaramillo, MC, Zhang, DD (2013) The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer, *Genes Dev.* 27, 2179–2191.
- Jayakumar, S, Madankumar, A, Asokkumar, S, et al. (2012) Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.* 360:51-60.
- Jeong, W, Jun, M, Kong, A, (2006) Nrf2: A potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid. RedoxSignal.* 8, 99–106.
- Jung, K, Kwak, M (2010) The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15, 7266–7291.
- Jung-Hynes B, Reiter RJ, Ahmad NJ. (2010) Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J Pineal Res*, 48:9–19.
- Kang, JS, Wanibuchi, H, Morimura, K, Gonzalez, FJ, Fukushima, S. (2007) Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 67:11141–11146.
- Kansanen, E, Kuosmanen, S, Leinonen, H, Levonen, A (2013) The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1 45–49.
- Kensler, T. (2008) Environmental Carcinogenesis, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins Bloomberg.
- Khalil A, Kabapy N, Deraz S, Smith C. (2011) HSP in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic target? *Biochim Biophys Acta.* 1816: 89-104.
- Klaunig J; Kamendulis, L; Hocevar, B; (2010) Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis *Toxicologic Pathology* 38: 96-109.
- Kostoglou-Athanassiou, I (2013) Therapeutic applications of melatonin. *Ther Adv Endocrinol Metab* 4(1) 13–24.
- Koul, A.; Bhatia, V.; Bansal, M.P. (2001) Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. *BMC Biochemistry*, 2:14.
- Kretzmann, N, Filmann, H, Mauriz, J, Marroni, C, Marroni, N, González-Gallego, J, Tuñón, M (2008) Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1504–1513.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Linehan, W.M, Rouault, T.A (2013) Molecular pathways: fumarate hydratase-deficient kidney cancer-targeting the Warburg effect in cancer, *Clin. Cancer Res.* 19, 3345–3352.
- Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G et al. (1996) Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer* 32A:1340–1343.
- Lissoni P, Rovelli F, Malugani F et al. (2001) Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol Lett.* 22:45–47.
- Lissoni P, Rovelli F, Meregalli S et al. (1997) Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J Biol Regul Homeost Agents* 11:157–159.
- Lissoni P. (2002) Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer* 10:110–116.
- Liu R, Fu A, Hoffman AE, Zheng T and Zhu Y (2013) Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways, *BMC Cell Biology*, 14:1.
- Liu RM, Gaston Pravia KA. (2010) Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 48: 1-15.
- Llesuy, S. F.; Milei, J.; Molina, H.; Boveris, A.; Milei, S. (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadimicin in mice. *Tumori*, 71: 241-249.
- Malhi, H; Kaufman R (2011). Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease *J Hepatol.* April 54(4): 795–809.
- Malik S, Bhatnagar S, Chaudhary N, Katare DP, Jain SK. (2013) DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. *Protoplasma*, 250, 175-83.
- Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. (2008) Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line *J. Pineal Res.* 45:532–540.
- Masotti, L., Casali, E., and Galeotti, T. (1988) Lipid peroxidation in tumour cells. *Free Radical Biol. Med.*, 4: 377-386.
- Mauriz, J, Gonzalez, P, Duran, M, Molpeceres, V, Culebras, J., Gonzalez-Gallego, J, (2007) Cell-cycle inhibition by TNP-470 in an in vivomodel of

- hepatocarcinoma is mediated by a p53 and p21WAF1/CIP1 mechanism, *Transl. Res.* 149, 46–53.
- Mauriz, J, González, P, Jorquera, F, Olcoz, J, González-Gallego, J (2003) Caspase inhibition does not protect against liver damage in hemorrhagic shock, *Shock* 19 33–37.
- Mauriz, J; Collado, P, Veneroso C; Reiter, R; González-Gallego, J (2013) A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives *J Pineal Res*, jan, v 54, 1 1-14.
- Mauriz, JL, Tunon, MJ, Gonzalez-Gallego, J. (2008) Apoptotic signaling pathways as a target for the treatment of liver diseases. *Mini Rev Med Chem* 8:1485-93.
- McCullough, KD, Martindale, JL, Klotz, LO, Aw, TY, Holbrook, NJ. (2001) Gadd-153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249-59.
- Melino, G. (2010) Journal club. A cancer biologist weighs up p53, metabolism and cancer. *Nature* 466, 905.
- Mills E, Wu P, Seely D and Guyatt G, (2005) Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis *J. Pineal Res.* 39:360–366.
- Misra, H. P. and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170-5.
- Molpeceres, V; Mauriz, J; Garcia-Mediavilla, M; Gonzalez, P; Barrio, J and Gonzalez-Gallego, J. (2007) Melatonin Is Able to Reduce the Apoptotic Liver Changes Induced by Aging Via Inhibition of the Intrinsic Pathway of Apoptosis *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, Vol. 62A, No. 7, 687–695.
- Moreira A, Rodrigues G, Bona S, Cerski T, Marroni C, Muriz J, Gonzalez Gallego J, Marroni N. (2015) Oxidative Stress and Cell Damage in a Model of Precancerous Lesions and Advanced Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Toxicology Reports* 2: 333-340.
- Moreira, A; Fraga, C; Alonso, M; Collado, P; Zetler, C; Marroni C; Marroni, N; Gonzalez-Gallego, J. (2004) Quercetin prevents oxidative stress and NF-kB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical Pharmacology* 68, 1939–1946.
- Muntané, J; la Mata, M. (2010) Nitric oxide and cancer, *World J. Hepatol* 2, 337–344.

- Nagahara, T., J. Okano, et al. (2010). Preventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biomed Pharmacother* 64(5): 319-326.
- Nakagawa H, Maeda S. (2012) Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK. *Patholog Res Int*.172894.
- Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, Asahara T, Ito A (2001) Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn J Cancer Res*. 92(3):249–256.
- Newell P, Villanueva A, Friedman S, Koike K, Llovet J, (2008) Experimental models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 48, 858–879.
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 22: 299-306.
- Ordonez, R, Carbajo-Pescador, S, Prieto-Dominguez, N, Garcia-Palomo, A, Gonzalez-Gallego, J, Mauriz, JL. (2014) Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. *J Pineal Res* 56:20-30.
- Otalora BB, Madrid JA, Alvarez N et al. (2008) Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice. *J Pineal Res* 44:307–315.
- Papazisis KT, Kouretas D, Geromichalos GD et al. (1998) Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. *J Pineal Res*, 25:211–218.
- Park T.J, Kim J.Y., Oh, S.P. et al. (2008) TIS21 negatively regulates hepato carcinogenesis by disruption of cyclin B1- Forkhead box M1 regulation loop. *Hepatology* 47, 1533–1543.
- Park, D; Shin, J; Park, S.; Seo, J.; Li, L.; Lee, M.; (2009) Diethylnitrosamine induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S phase regulatory protein in rat. *Toxicology Letters*, 191, 321-326.
- Perdomo, J; Cabrera, J; Estévez, F; Loro, J; Reiter, R; Quintana, J; (2013) Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J Pineal Res*, 55(2):195-206.
- Petranka J, Baldwin W, Biermann J et al. (1999) The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res*, 26:129–136.

- Pitot H.C. & Dragan Y.P. (1991) Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* 5, 2280–2286.
- Poirier L. (2002) The Effects of Diet, Genetics and Chemicals on Toxicity and Aberrant DNA Methylation: an Introduction, *J. Nutr.* 132: 2336S–2339S.
- Poli, G., Cecchini, G., Biasi, F., Chiarpotto, E., Canuto, R. A., Biocca, M. E., Muzio, G., Esterbauer, H., and Dianzani, M. U. (1986) Resistance to oxidative stress by hyperplastic rat liver tissue monitored in terms of unipolar and medium polar carbonyls. *Biochim. Biophys. Acta* 883: 207-214.
- Puthalakath, H, O'Reilly, LA, Gunn, P, et al. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129:1337-49.
- Qi Y.T., Chen X., Chan C.Y. et al. (2008) Two-dimensional differential gel electrophoresis/ analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 122, 2682–2688.
- Rahman, KM, Sugie, S, Watanabe, T, Tanaka, T, Mori, H. (2003) Chemopreventive effects of melatonin on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr Cancer* 47:148-55.
- Rajasekaran, D, Elavarasan, J, Sivalingam, M, et al. (2011) Resveratrol interferes with N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma at early and advanced stages in male Wistar rats. *Mol Med Rep.* 4:1211-7.
- Rampino, N, Yamamoto, H, Ionov, Y, et al. (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275:967-9.
- Reiter R J. (2004) Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res.* 37:213–214.
- Reiter RJ, Tan DX (2002) Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann NY Acad Sci* 957: 341–344.
- Reiter, R, Tan, D; Manchester, L; Qi, W. (2001) Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 34, 237-256.
- Reiter, R; Tan D; Mayo, J. Sainz, R; Leon, J; Czarnocki, Z (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans *Acta Bioch Polonica* v50 (4) 1129-1146.

- Reiter, R; Tan D; Terron, P; Flores, L; Czarnocki, Z. (2007) Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions *Acta Bioch Polonica*, 54, (1) 1-9.
- Reuber MD, (1965) Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0.025 percent N-2-fluorenyldiacetamide *J. Natl. Câncer Inst.* 34(6):697-723.
- Rohde, M, Daugaard, M, Jensen, MH, Helin, K, Nylandsted, J, Jäättelä, M (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms, *Genes Dev.* 19, 570–582.
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, (2004) Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB: Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, 39(6):1739–1745.
- Ross, D, Beall, H, Siegel, D, Traver, R, Gustafson, D. (1996) Enzymology of bioreductive drug activation, *Br. J. Cancer Suppl.* 27 S1–S8.
- Ross, D, Kepa, J, Winski, S, Beall, H, Anwar, A, Siegel, D, (2000) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms, *Chem. Biol. Int.* 129, 77–97.
- Sacco S, Aquilini L, Ghezzi P et al. (1998) Mechanism of the inhibitory effect of melatonin on tumor necrosis factor production in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 343:249– 255.
- Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ (2003) Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 60: 1407-1426.
- Sakamoto, M, Effendi, K, Yohei, M. (2010) Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis, *Jpn J Clin Oncol.* 40 (9) 891–896.
- Sang, W, Zhang, W, Cui, W, Li, X, Abulajiang, G, Li Q, (2015) Arginase-1 is a more sensitive marker than HepPar-1 and AFP in differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from nonhepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 36:3881–3886.
- Santos, NP, Oliveira, PA, Arnates-Rodrigues, R, Faustino-Rocha, AI, Colaço, A, Lopes, C, Gil da Costa, RM. (2014) Cytokeratin 7/19 expression in N-

- diethylnitrosamine induced mouse hepatocellular lesions: implications for histogenesis, *Int J Exp Pathol.* 95:191-8.
- Satoh, H, Moriguchi, T, Takai, J, Ebina, M, Yamamoto, M (2013) Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis, *Cancer Res.* 73, 4158–4168.
- Shafizadeh, N., Kakar. S. (2011) Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol*; 18: 438–445.
- Shiota G., Harada K., Ishida M. et al. (1999) Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine- treated mice. *Carcinogenesis* 20, 59–63.
- Shiu SY, Law IC, Lau KW et al. (2003) Melatonin slowed the early biochemical progression of hormone-refractory prostate cancer in a patient whose prostate tumor tissue expressed MT1 receptor subtype. *J Pineal Res.* 35:177–182.
- Siebenlist, U.; Franzoso, G.; Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10:405-455.
- Sivaramakrishnan, V, Devaraj, SN. (2010) Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model. *Chem Biol Interact.* 183:284-92.
- Souza, A., Meurer, L., Silveira, T. R., Gregorio, C., Reus, N., Uribe, C., Matte, U., and Santos, J. L. (2014) Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 are associated with medial thickening of hepatic arterial branches in biliary atresia. *Pediatric Research* 75 1: 22-28.
- Sporn, M, Libby, K (2012) Nrf2 and cancer: the good, the bad and the importance of context, *Nat. Rev. Cancer* 12, 564–571.
- Srinivasan, V, Spence, DW, Pandi-Perumal, SR., Trakht, I, Cardinali, DP. (2008) Therapeutic Actions of Melatonin in Cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther.* 7: 189-203.
- Subramanian P., Mirunalini, S., Dakshavani, KB, Pandi-Perumal, SR., Trakht I., Cardinali, DP. (2007) Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. *J. Pineal Res.* 43:305–312.
- Tabruyn S.P. and Griffioen, A.W. (2008) NF- κ B: a new player in angiostatic therapy, *Angiogenesis*, **11**, 101–106.
- Tan et al, (2012) Metabolomics Study of Stepwise Hepatocarcinogenesis From the Model Rats to Patients: Potential Biomarkers Effective for Small Hepatocellular Carcinoma Diagnosis, *Molecular & Cellular Proteomics* 11: 1–12.

- Teoh NC, Dan YY, Swisshelm K, et al. (2008) Defective DNA strand break repair causes chromosomal instability and accelerates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 47(6):2078–2088.
- Terblanche, J; Hickman, R. (1991) Animal models of fulminant hepatic failure. *Digest Dis. Sci.* 36(6):770-774.
- Thannickal, V.L. and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. Journal Physiol. Lung Cell Mol Physiol*, 279, L:1005-L:1028.
- Thanos, D. and Maniatis, T. (1995) NF κ B: a lesson in family values. *Cell* v 80; p 529-32.
- Thoolen, B., Kate, F.J.W., Diest, P.J., Malarkey, D.E., Elmore, S.A. and Maronpot, R. R. (2012). Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions. *J Toxicol Pathol.* 25: 189–199.
- Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M., Brix, A., Singh, B., Belpoggi, F. and Ward, J.M. (2010). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system, *Toxicol Pathol.* 38: 5S-81S.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, et al. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-21.
- Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, Marroni NP, González-Gallego J. (2009) Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr.* 139: 1339-46.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 39:99–104.
- Towbin, H., Staehelint, T., Gordon, J., (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4.
- Travacio, M. and Llesuy, S. (1996) Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Cien e Cultura – Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* vol 48:1/2, p. 9-13.
- Tripathi, D. and Jena, G. (2010) Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat, *J. Pineal Res.* 48:324–331.

- Tuñón, M. J., San-Miguel, B., Crespo, I., Laliena, A., Vallejo, D., Alvarez, M., Prieto, J., and González-Gallego, J. (2013). Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res.* 55, 221-8.
- Van den Heiligenberg S, Depres-Brummer P, Barbason H et al. (1999) The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Life Sci.* 64:2523–2534.
- Van Eyken, PL, Sciote, R, Paterson, A, Callea, F, Kew, MC, Desmet, VJ. (1988) Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 19; 562–568.
- Vásquez-Garzón, V, Macias-Pérez, J, Jiménez-García, M, Villegas, V, Fattel-Fazenta, S, Villa-Treviño, S (2013) The chemopreventive capacity of quercetin to induce programmed cell death in hepato-carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 41 857–865.
- Venugopal, R, Jaiswal, A, (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 14960–1496.
- Verna L, Whysner J, Williams GM. (1996) N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.* 71(1-2):57–81.
- Vesselinovitch SD, Mihailovich N. (1983) Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.* 43(9):4253–4259.
- Vezozzo, D C e Carrilho, F J (2014) Rastreamento do carcinoma hepatocelular: como e quando? *Oncol* jan/ fev, 30-33.
- Vriend J; Reiter, R. (2015) The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Molecular and Cell Endocrinology* 401 213-220.
- Vuillaume M, (1987) Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat Res.* 186 (1):43-72.
- Vydra N, Toma A, Widlak W. (2014) Pleiotropic Role of HSF1 in Neoplastic Transformation. *Curr Cancer Drug Targets* 14: 144-155.
- Walston, J. (2015) Inflammation and Cancer, www.jeanninewalston.com, august, 2015.

- Wang X, Finegan KG, Robinson AC, Knowles L, Khosravi-Far R, Hinchliffe KA et al (2006) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death Differ.* 13:2099-2108.
- Wang Z.Y., Agarwal R., Khan W.A., Mukhtar H. (1992) Protection against Benzo[a] Pyrene-induced and N-Nitrosodiethylamine- induced lung and forestomach tumorigenesis in a/ J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis* 13, 1491–1494.
- Wei, CL, Hon, WN, Lee, KH, Mori, M, Gotoh, T, Khoo, HE, (2002) Induction of arginase II in livers of bile duct ligated rats. *Biochemical Pharmacology* 63, 1043-1050.
- Williams B; Lipkin, W. (2006) Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration in Rats Neonatally Infected with Borna Disease, *Virus J Virol Sept*, v 80, n17, p8613-8626.
- Williams G.M., Iatropoulos M.J., Jeffrey A.M. (2000) Mechanistic basis for nonlinearities and thresholds in rat liver carcinogenesis by the DNA-reactive carcinogens 2-acetylaminofluorene and diethylnitrosamine. *Toxicol. Pathol.* 28, 388– 395.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., Wang, C. X., Ali, N., Rivenson, A., Peterson, L. A., Schulz, C and Gebhardt, R. (1996). Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA damage, centrilobular cytotoxicity, cell proliferation and carcinogenesis in rat liver exhibit some non-linearities. *Carcinogenesis* 17, 2253-8.
- Yadav, RK, Chae, SW, Kim, HR, Chae, HJ. (2014) Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev.* 19:75-88.
- Yamaguchi, H, Wang, HG. (2004) CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem.* 279:45495-502.
- Ye, F, Jing Y, Guo, SW, Yu, GF, Fan, QM, Qu, FF, Gao, L, Yang, Y, Wu, D, Meng, Y, Yu, FH and We, LX, (2014) Proliferative ductular reactions correlate with hepatic progenitor cell and predict recurrence in HCC patients after curative resection. *Cell & Bioscience*, 4:50.
- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 20:6755–6767.

- Yoshida, H, Matsui, T, Yamamoto, A, Okada, T, Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881-91.
- Yoshino, H., Futakuchi, M., Cho, Y., Ogawa, K., Takeshita, F., Imai, N., Tamano, S., Shirai, T. (2005) Modification of an in vivo lung metastasis model of hepatocellular carcinoma by low dose N-nitrosomorpholine and diethylnitrosamine. *Clinical & Experimental Metastasis* September, 22, issue 5, pp 441-447
- Zha L, Fan L, Sun G, Wang H, Ma T, Zhong F, Wei W (2012) Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Pineal Res.* 52: 322–331.
- Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124:587–599.
- Zhang K; Kaufman R (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.
- Zhang, D; Friedman, S (2012) Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 56, 769–775.
- Zhang, Q, Ma, Z, Xin, Q, Liu, GQ, Liu, BB, Gao, YT, Zhang, CS, Du, Z. (2013) Diagnostic value of absent ductular reaction at hepatocellular-stromal boundaries in early stage hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* Dec; 21(12):924-8.
- Zimmers T.A., Jin X.L., Gutierrez J.C. et al. (2008) Effect of in vivo loss of GDF-15 on hepatocellular carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 753–759.

Anexos

ANEXO A

Cartas de Aprovação dos Projetos pelo Comitê de Ética em Pesquisa



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: 120355

Data da Versão do Projeto: 25/10/2012

Pesquisadores:

NORMA ANAIR POSSA MARRONI

ANDREA JANZ MOREIRA

SILVIA BONA

Título: CARCINOMA HEPATOCELULAR: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO
EXPERIMENTAL

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, 22 de novembro de 2012.

Dr. Alessandro Osvaldo
Coordenador CEUA/HCPA



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

ANEXO B

Rotinas de descarte dos materiais biológicos e tóxicos.

Materiais tóxicos (como frascos de DEN, seringas, luvas) utilizados eram descartados em lixo próprio para materiais quimioterápicos ou tóxicos (identificados pela cor laranja).

Os animais, após sua morte, eram devidamente embalados em saco plástico branco, rotulados com seu respectivo número e número do projeto e acondicionado em freezer específico existente na Unidade Experimental Animal (UEA) do HCPA.

O material DEN e AAF eram acondicionados em armário de material controlado, sob supervisão da coordenação da UEA, sendo liberado apenas por solicitação da pesquisadora responsável.

ANEXO C
Artigo Piloto:

Protoplasma (2015) 252:825–833
DOI 10.1007/s00709-014-0719-8

ORIGINAL ARTICLE

Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study

Silvia Bona · Andrea Janz Moreira · Graziella Ramos Rodrigues ·
Carlos Thadeu Cerski · Themis Reverbel da Silveira ·
Claudio Augusto Marroni · Norma Possa Marroni

Received: 19 March 2014 / Accepted: 13 October 2014 / Published online: 5 November 2014
© Springer-Verlag Wien 2014

Abstract The experimental models of the development of cirrhosis in rats require a long time. Many studies in animals have demonstrated similarities in histological pattern with human cirrhosis. Just like the relation between cirrhosis and increased lipid peroxidation (LPO), which contributes to the worsening of the disease. However, few studies have focused on the reduction of time to establish cirrhosis and evaluated the expression of heat-shock protein 70 (HSP70) in cirrhotic livers of rodents. The present study proposes the adaptation of an experimental cirrhosis model using diethylnitrosamine (DEN). Twenty-six male Wistar rats, weighing ± 270 g, divided into two groups: (i) CO-control and (ii) DEN-diethylnitrosamine. The DEN group received 50 mg/kg of DEN twice a week intraper-

itoneally for 7 weeks. The model developed cirrhosis in 7 weeks. The liver function tests showed that the animals with DEN-induced cirrhosis had increased levels when compared to control. The histological examination showed changes in the liver architecture, with severe ductal proliferation, signs of chronic damage, cholestasis, lymphocytic infiltrate, steatosis, and extensive parenchymal loss. We also found nodular formations with homogeneous pattern, increased LPO, increased expression of iNOS, TGF beta, α -SMA, and NQO1. However, the HSP70 expression was reduced in cirrhotic animals. This study showed signs of cirrhosis in liver based on biochemical, histological, and molecular analysis. The reduced expression of HSP70 appears to be associated with increased oxidative stress, contributing to the worsening of the disease.

itoneally for 7 weeks. The model developed cirrhosis in 7 weeks. The liver function tests showed that the animals with DEN-induced cirrhosis had increased levels when

Keywords Liver · Hepatotoxicity · Oxidative stress · Cirrhosis

Handling Editor: Reimer Stick

S. Bona · G. R. Rodrigues · N. P. Marroni
Postgraduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, Brazil

S. Bona · A. J. Moreira · G. R. Rodrigues · T. R. da Silveira ·
N. P. Marroni
Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, Brazil

A. J. Moreira · N. P. Marroni
Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite,
500, Porto Alegre, RS, Brazil

C. T. Cerski
Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, Brazil

C. A. Marroni
Postgraduate Program in Liver Diseases, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

N. P. Marroni
Postgraduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Av. Farroupilha, 8001, Canoas, RS, Brazil

N. P. Marroni (✉)
Rua José Kanan Aranha, 102, Porto Alegre, RS, Brazil CEP:
91760470
e-mail: nmarroni@terra.com.br

Introduction

Chronic liver diseases are one of the major health problems worldwide. Cirrhosis is the most common liver disease, causing the death of thousands every year. This disease results from successive cellular, biochemical, and molecular events that lead to changes in the hepatic parenchyma and increase collagen deposition. Formation of nodules, anatomical changes, and death of hepatocytes also occur (Friedman 2008).

Many studies have shown the relationship between cirrhosis and increased lipid peroxidation (LPO). The elevated generation of reactive oxygen species (ROS) contributes to the worsening of the disease. The administration of antioxidants seems to change the outcome of cirrhosis in animal models, demonstrating the promising use of these substances in cirrhotic livers (Bona et al. 2012; Tieppo et al. 2009; Wasser et al. 2001). However, few studies have evaluated the expression of heat-shock protein 70 (HSP70) in cirrhotic livers of rodents. The HSP70 are chaperones sensitive to cellular stress. They are involved in numerous cellular functions such as folding of proteins, transport, and protein degradation (Gupta et al. 2010). In addition to HSP70, NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) also plays a role in cellular stress. This protein with enzymatic activity prevents the one electron reduction of quinones, thus acting in the cellular antioxidant defense and also playing an antioxidant role in exogenous xenobiotics and drugs (Ross 2004). Likewise, NQO1 reduces

oxidative stress and LPO. This enzyme is also capable of scavenging superoxide anions generated during oxidative stress and regenerating reduced forms of protective endogenous antioxidant compounds (Aleksunes et al. 2006; Ross 2004; Siegel et al. 1997).

Because of the importance of redox state in cirrhosis, there is need to investigate the pathophysiological mechanisms that are triggered and to propose new effective therapies in the treatment of cirrhotic livers. Therefore, experimental research in animal models provides controlled conditions to identify markers of oxidative stress or therapeutic targets for liver disease.

The experimental models of cirrhosis currently used are induced by chemical substances such as diethylnitrosamine (DEN) (Haratake et al. 1991) or carbon tetrachloride (CCl₄) (Bona et al. 2012; Cameron and Karunarete 1936; Jiménez et al. 1992) or by bile duct ligation (BDL) (Tieppo et al. 2009). These cirrhosis models demonstrate many similarities in the histological pattern and changes in liver integrity compared to human cirrhosis.

The objective of the present study was to propose an experimental cirrhosis model chemically induced with DEN to evaluate LPO, expression of stress-sensitive proteins (NQO1 and HSP70), and fibrosis marker (TGF- β 1 and α -SMA).

Materials and methods

Animals and procedures

Male Wistar rats weighing 230–250 g were used in our study. Rats were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The animals were caged at 24 °C, kept on a 12/12-h light–dark cycle, and with free access to food and water until the time of experiments in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All experiments were performed in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS) under protocol no. 09–588.

Phenobarbital at a concentration of 0.3 g/L was added to the drinking water of animals 7 days before the first DEN administration and subsequently throughout the experiment to cause enzyme induction and shorten the time required for the development of cirrhosis (Li et al. 2012; Cremonese et al. 2001). The animals were divided into two groups: (i) CO-control and (ii) DEN-diethylnitrosamine. The CO group received the same amount of vehicle for 7 weeks. The DEN group received 50 mg/kg of DEN twice a week intraperitoneally for 7 weeks.

After fasting for 12 h, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (Ketalar® 100 mg/kg) and xylazine (50 mg/kg) and subjected to blood collection for measurement of biochemical analysis. Liver samples were removed for histological and biochemical analysis. The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, as described in the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines on Euthanasia (AVMA 2007).

Histology

For histological examination, a sample of the liver was trimmed and fixed by immersion in 10 % buffered formalin for 24 h. The blocks were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in paraffin wax. Serial 3- μ m sections were stained with hematoxylin/eosin and picosirius.

Biochemical analysis, LPO and SOD activity

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) (U/L) and aspartate aminotransferase (AST) (U/L) were determined by kinetic UV test. Gamma-glutamyl transferase (gamma-GT) (U/L) and alkaline phosphatase (AP) (U/L) were quantified by colorimetric kinetic test. They were measured using routine laboratory methods of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre by enzymatic method (automated–Siemens Advia 1800 Chemistry system).

The livers were excised, weighed, and immediately frozen at -70°C . Frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Protein concentration in the liver homogenates was determined using a bovine albumin solution as described by Bradford (1976). Oxidative stress was determined by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS nmol/mg protein) (Buege and Aust 1978). The amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was quantified by the thiobarbituric acid reaction using 3 mg of protein per sample. Results were expressed as TBARS. The samples were incubated at 90°C for 30 min after adding 500 μL of 0.37 % thiobarbituric acid in 15 % trichloroacetic acid. Next, they were centrifuged at 4°C at 2000 g for 15 min. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535 nm. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant as 535 nm. Cytosolic SOD (EC 1.15.1.1) was assayed as described by Misra and Fridovich (1972).

Western blot

Western blot analysis were performed on cytosolic extracts prepared by liver tissue homogenization in 140 mM NaCl, 15 mM EDTA, 10 % glycerol, 20 mM, and a protease inhibitor cocktail (Laemmli 1970). The mixture was incubated on ice for 30 min and centrifuged for 30 min at 12,000 g and 4°C . The supernatant fraction was recollected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration was measured by the Bradford assay. Samples containing 50–100 μg of protein were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (9–12 % acrylamide) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The membranes were then blocked with 5 % nonfat dry milk in tris saline buffer containing 0.05 % Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4°C with polyclonal anti-TGF- 1β (SC31609/25 kDa), anti-NQO1 (SC376023/31 kDa), and anti-iNOS (SC7271/131 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibodies at 1:200–1:1000 dilution with TTBS in 5 % nonfat dry milk; anti- α -SMA (A2547/42 kDa), anti-HSP70 (H5147/70 kDa), and anti-HSF-1 (H4163/75 kDa) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) antibody at 1:5000 dilution with TTBS in 5 % nonfat dry milk; anti- β -actin polyclonal antibody (A5060/42 kDa) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at 1:2000 dilution with TTBS in 5 % nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4000). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great Britain). The density of the specific bands

was quantified with an imaging densitometer L-Pix Chemi Molecular Imaging (Tuñón et al. 2013).

Statistical analysis

Means and standard deviation (SD) were calculated for all data. Significant differences between means were evaluated by Student's *t* test. Significance level was set at $p < 0.05$.

Results

The weight of the animals varied significantly between the two groups. The rats that received 50 mg/kg of DEN twice a week showed a slower growth rate than controls. As shown in Fig. 1, the DEN group started to lose weight in the 7th week.

Histology

The histological examination of the DEN group with 7 weeks showed changes in liver architecture, with severe ductal proliferation. We found signs of chronic damage such as cholestasis, lymphocytic infiltrate, hepatocytes with extremely atypical enlarged nuclei, steatosis, and extensive parenchymal loss. We also detected nodular formations with well-defined nodules. These formations were similar to micronodular cirrhosis with septal fibrosis, showing possible homogeneous pattern of nodules of collagen deposition (Fig. 2).

Transaminase activities

Liver integrity included determination of serum aminotransaminase enzymes (aspartate and alanine aminotransferase), gamma-glutamyl transferase (gamma-GT), and alkaline phosphatase (AP). Aminotransaminase enzymes were significantly different in the DEN group, signaling that there is injury to hepatocytes caused by necrosis or changes in the permeability of the cell membrane (Table 1). The AST/ALT ratio was greater than 1, indicating evolutionary framework for cirrhosis. The elevation of AP and gamma-GT were concomitant in DEN group. Gamma-GT and alkaline phosphatase activities were significantly differ between the two groups, $p < 0.05$ (Table 1). We emphasize that the values of gamma-GT in rats are very low under normal conditions, however in animals using DEN these values are significantly elevated, $p < 0.05$.

Marker of LPO and SOD activity

The cytosolic concentration of TBARS increased in the animals treated with DEN during 7 weeks (DEN group) ($p < 0.05$)

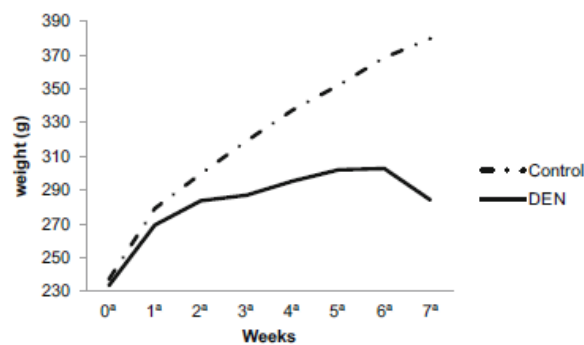


Fig. 1 Weight variation of the control and DEN groups per week. $p < 0.05$ compared DEN group with control group

(Fig. 3). The LPO measurement by TBARS demonstrated a significant increase in DEN rats (+41 %) (means: 0.17 nmoles/mg prot SD \pm 0.04) vs. CO rats (means: 0.12 nmoles/mg prot SD \pm 0.02). While SOD activity decreases significantly in the animals of group DEN (means: 18.2 U SOD/mg prot SD \pm 0.6) vs. CO rats (means: 23.49 U SOD/mg prot SD \pm 2) (Fig. 3).

Fig. 2 Effect of DEN during 7 weeks on collagen deposition in the liver. The signs of chronic damage were: cholestasis, steatosis, and parenchymal loss. The nodular formations were similar to micronodular cirrhosis. a Liver macroscopy of control (CO) rats (left) and DEN intoxication (right). b Liver histologic sections using hematoxylin and eosin staining with 10 \times amplification of CO rats (left) and DEN intoxication (right). c Liver histologic sections using picrosirius staining with 10 \times amplification of CO rats (left), DEN intoxication (right)

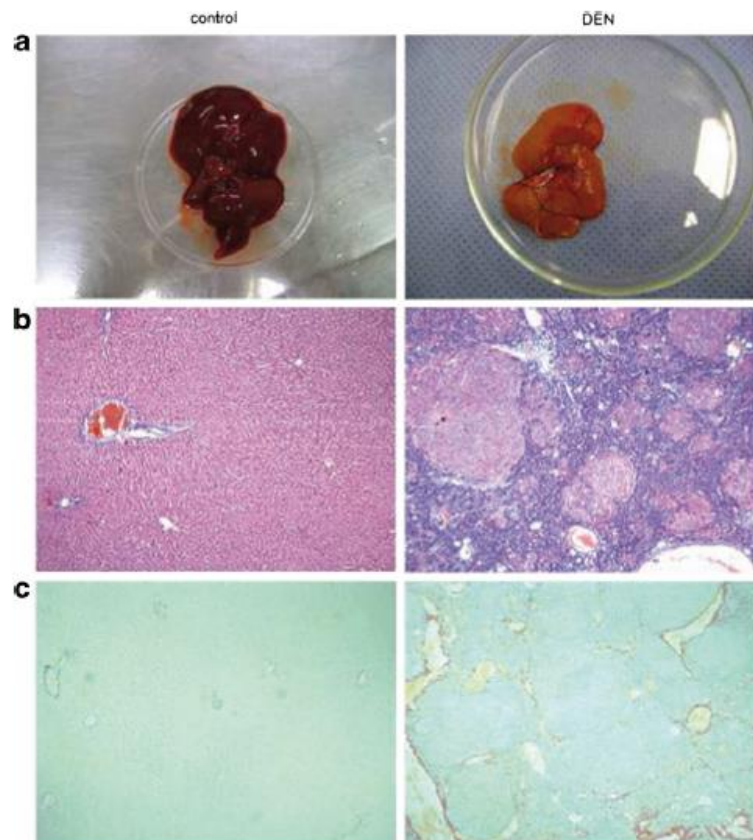


Table 1 Effects of DEN for 7 weeks on the serum levels of AST, ALT, AP, and gamma-GT activities

u	Control	DEN	<i>p</i>
AST (U/L)	116.75 \pm 25.7	1241.4 \pm 83.3	*
ALT (U/L)	49.0 \pm 9.52	428.10 \pm 218	*
AP (U/L)	124.25 \pm 38.8	188.6 \pm 57.3	*
GGT (U/L)	-0.75 \pm 0.9	8.72 \pm 4.4	*

Values are expressed as means \pm SD for 6 to 8 rats

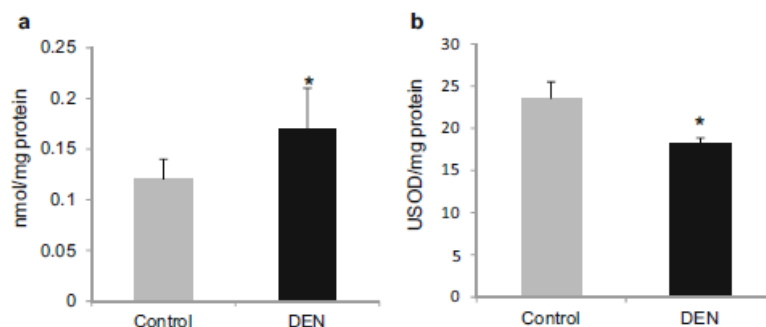
AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase, AP alkaline phosphatase, GGT gamma-GT

* $P < 0.05$ compared with control group

Protein expression—NQO1, TGF- β 1, α -SMA, iNOS, HSF-1, and HSP70

The proteins NQO1, iNOS, HSP70, and HSF-1 were quantified by measurement of protein expression—Western Blot (Fig. 4). The animals of the DEN group showed higher induction of NQO1 protein compared to control rats (+54 %). DEN animals showed overexpression of iNOS protein. The expression of HSF-1 was reduced in cirrhotic group. Similar

Fig. 3 Effects of DEN administration on liver TBARS concentration (a) and the antioxidant enzyme SOD activity (b). Values are expressed as means \pm SD for 8 to 10 rats. * P < 0.05 compared with control group



behavior, cHSP70 and iHSP70, were decreased in the animals of the DEN group (-21 % and -40 %, respectively).

To evaluate the effects of experimental cirrhosis induced by the DEN treatment on fibrosis production, the expression of TGF- β 1 and α -SMA (Fig. 5) were quantified. DEN coursed with a significant induction of TGF- β 1 protein (+70 %); α -SMA expression strongly increased in cirrhotic animals.

Discussion

Liver diseases are one of the biggest health problems in the world. In this context, cirrhosis is the major cause of chronic inflammatory liver diseases, resulting in the destruction of liver parenchyma and its replacement by fibrosis (Gressner et al. 2007). Liver cirrhosis includes anatomical changes in liver function due to death of hepatocytes, which is characterized by the formation of fibrotic nodules. These structural changes are the response of liver tissue to numerous inflammatory, viral, toxic, and metabolic attacks or liver failure.

Our results suggest that the adaptation proposed by this study using DEN 50 mg/kg twice a week (Haratake et al. 1991) associated with the use of phenobarbital in the drinking water of the animals at a concentration of 0.3 g/L, 7 days before the first application and thereafter, throughout the experiment contributed to the time required for the development of cirrhosis (Li et al. 2012; Cremonese et al. 2001). The use of enzyme inducers, with hepatotoxicity causing chemical-driven liver damage, is mentioned in several studies to enhance the onset of the illness. Phenobarbital associated with DEN accelerates the development of liver cirrhosis, thus increasing the expression of cytochrome P450, which acts by increasing metabolism of DEN resulting in a significant increase in the formation of free radicals inducing oxidative stress (Imaoka et al. 2004). With this design, cirrhosis is already established in the 7th week, suggesting that the therapeutic window occurs in the 4th and 5th weeks. Regarding survival after 8 weeks, the percentage of deaths rises by 50 %; and at 10 weeks, about 80 % of the animals will die.

The DEN for 7 weeks used in our study is an animal model characterized by hepatic cirrhosis, with changes in liver architecture and severe ductal proliferation. We found signs of chronic damage, cholestasis, lymphocytic infiltrate, steatosis, and extensive parenchymal loss. Nodular formations were also present, showing well-defined nodules similar to micronodular cirrhosis with septal fibrosis. There was a possible homogeneous pattern of nodular collagen deposition.

In addition to the similar histological appearance, the abnormal liver integrity were consistent with cirrhosis. After 7 weeks, the increased levels of the two aminotransferases (AST and ALT) and the canalicular enzymes (AP and gamma-

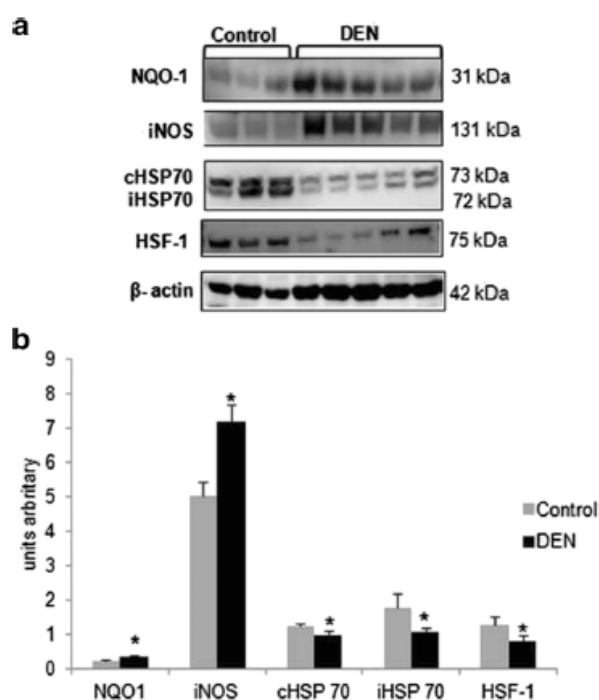


Fig. 4 Western blot (WB) analysis. a Cytoplasmic fractions were analyzed by WB with NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), heat-shock protein, cognate (cHSP70), and induced (iHSP70), heat-shock factor 1 (HSF-1) and β -actin antibodies. b Arbitrary values expressed as mean and standard deviation. * P < 0.05 compared with control group

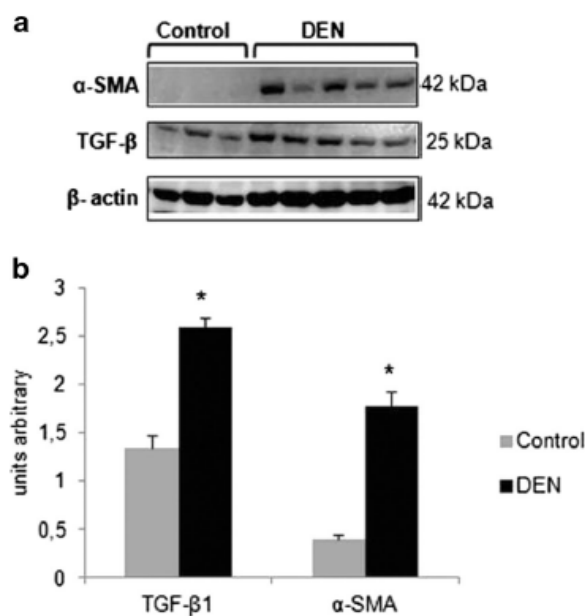


Fig. 5 Western blot (WB) analysis. a Cytoplasmic fractions were analyzed by WB with alpha-smooth muscle actin (α -SMA), hepatic tumor growth factor-beta 1 (TGF- β 1), and β -actin antibodies. b Arbitrary values expressed as mean and standard deviation. * $P < 0.05$ compared with control group

GT) exceeded five times the upper limit of normality (ULN), suggesting cirrhosis, primary biliary cirrhosis, or cholangitis (Sturgill and Lambert 1997).

The first bioactivation step of DEN is P450-mediated α -hydroxylation, producing α -hydroxyl nitrosamine. DEN is mainly hydroxylated by the ethanol-inducible CYP2E1 in the liver (Swenberg et al. 1991; Verna et al. 1996). DEN is hydrolyzed in nitrosamine generating an electrophilic radical. The ethyl radical results in oxidant injury, (Malik et al. 2013) increasing the generation of ROS. Oxidative stress may play an important role in the pathogenesis of cirrhosis and the development of septal fibrosis (Liu and Gaston Pravia 2010). It has been defined as an imbalance between pro- and antioxidants, and ROS-induced LPO can occur either in situations in which scavenging systems are overwhelmed (excessive production of ROS) or when the antioxidant systems are impaired (Michiels et al. 1994). We determined the LPO level of the liver. The cytosolic concentration of TBARS increased in the animals with cirrhosis (DEN group) ($\pm 41.6\%$) compared to controls. We observed reduction in antioxidant defenses. SOD activity was lower in the animals receiving DEN. The lack of antioxidant enzyme favors the maintenance of oxidative stress by accumulation of reactive oxygen species (ROS). Many studies have demonstrated that LPO may be triggered by the superoxide burst; and, as a consequence, causes the appearance of toxic products such as reactive aldehydes (Bona et al. 2012; Teufelhofer et al. 2005).

In the present investigation, the expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) was significantly increased in the DEN group. This protein contributes to the dismutation of superoxide commonly generated during cirrhosis (Siegel et al. 2004). We observed that animals with experimental cirrhosis with higher LPO expressed more NQO1 compared to controls, which coincides with the higher levels of metabolic products of LPO in this model. Several studies have demonstrated increased production of ROS in different cirrhotic models (Bona et al. 2012; Cremonese et al. 2001; Jiménez et al. 1992; Tieppo et al. 2009). Venugopal and Jaiswal (1996) suggested that the increase in the expression of NQO1 occurs in response to the generation of ROS caused by inflammation or use of xenobiotic substances.

The transduction of intracellular signals stimulated by TGF- β results in stimulation of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and collagen. α -SMA is the marker most commonly used in experimental and clinical studies related chronic liver disease, being accepted as an indicator of activation of hepatic stellate cells (HSCs) (Gressner et al. 2002, 2007). We evaluated the expression of TGF- β 1 and α -SMA, which were increased in all rats exposed to DEN for 7 weeks and manifested as micronodular cirrhosis with septal fibrosis. González-Ramos et al. (2013) observed that the TGF- β 1 upregulation increases the expression of the ECM proteins (type I collagen and fibronectin). Activation of HSCs plays a central role in liver fibrosis and α -SMA is an established indicator of HSC activation (Battaller and Brenner 2005; Brenner et al. 2013; Altrock et al. 2014). We found a significant increase in expression of the TGF- β 1 and α -SMA protein in cirrhotic animals. In summary, our proposed result in collagen accumulation and impaired liver function.

Unresolved inflammation can stimulate a fibrotic/cirrhotic response characterized by an irreversible decline in liver functions (Brenner et al. 2013). There is increasing evidence that changes in redox homeostasis may play a significant role in the pathogenesis of many diseases characterized by chronic inflammation, activation of the healing process, and fibrogenesis of the liver tissue. Corpechot et al. (2002) investigated in vivo the relationships between hypoxia, angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and the collagen expression in DEN-induced liver fibrosis. They observed a pathologic vicious circle in the development of cirrhosis. Their results showed that fibrogenesis, angiogenesis, and hepatic hypoxia are associated in the repair process. iNOS is upregulated in response to stress, catalyzing intense quantities of NO. Our result demonstrated a marked increase in iNOS expression in cirrhotic animals, typical feature of the inflammation process. We believe it will be necessary studies of gene expression of genes involved with cirrhosis; among them, we highlight α -SMA, CTGF and TGF- β genes, well as nuclear factor κ B, and its subunits which are markers of inflammation.

In addition to the presence of increased TGF- β 1, α -SMA, and iNOS expression, our investigation demonstrated a significantly reduced cytoplasmic HSP70 expression in the liver with experimental cirrhosis induced by DEN. iHSP70 has strong cytoprotective effects and functions as a molecular chaperone in protein folding, transport, and degradation. Moreover, the cytoprotective effect of iHSP70 is also related to its ability to inhibit apoptosis (Gupta et al. 2010). DEN inhibited iHSP70 expression because DEN is a potent xenobiotic substance that induces inflammation and cirrhosis in liver tissue. In response to diverse stimuli, including ROS, many nuclear factors are activated and translocated into the cell nucleus (Verma and Stevenson 1997). Results of this study demonstrated that in rats with experimentally induced cirrhosis results in downregulation of iHSP70.

Increased levels of HSP are essential for cell adaptation to stress. The inability to respond to stress or inhibition of iHSP70 expression results in increased cellular vulnerability under stress conditions (Lindquist and Craig 1988; Rodrigues-Krause et al. 2012). The cellular ability to respond to stress appropriately is critical to their survival. In chronic diseases, cells lose their sensitivity to detect threats. This inability to activate the stress-sensitive proteins, such as HSP, causes dysfunctions in folding, transport, and protein degradation (Hooper and Hooper 2005). Under pathological conditions, the level of such misfolded proteins may exceed the protective machinery of the cell to either maintain them in a soluble form or degrade them, resulting in cell accumulation, dysfunction, and death (Adachi et al. 2009; Krause and Rodrigues-Krause 2011). Oxidative stress may induce conformational changes of proteins, and consequently, an overexpression of specific molecular chaperones such as those of the HSP70 family (Gomer et al. 1996; Jacquier-Sarlin et al. 1995). In our experimental model, the level of HSP70 expression was modified in the cirrhotic livers of DEN-treated rats. We believe that the reduction in expression of the HSP70 protein could aggravate the cirrhosis. Mikami et al. (2004) investigated the inducibility and cytoprotective effect of HSP72 on LPS induced liver injury in cirrhotic rats by CCl₄. They demonstrated that cirrhotic rats showed less HSP70 expression. When treatment stimulated the HSP70, cirrhotic animals improved the clinical aspect. Watanabe et al. (2004) evidenced that in cirrhotic rats by bile duct ligation, the expression of HSP72 in gastric mucosa was inversely related to the elevation of portal venous pressure with increasing severity of liver cirrhosis.

In this study, the iHSP70 and cHSP70 were downexpressed. It is known that HSP transcription requires the activation of the heat-shock factor (HSF1), which involves its nuclear translocation, phosphorylation, trimerization, and binding to the heat-shock element (HSE) in the promoter region of HSP genes (Morimoto et al. 1996; Sarge et al. 1993). Jacquier-Sarlin and Polla (1996) reported that H₂O₂ could inhibit HSF1 binding to DNA probably by oxidizing

critical cysteine residues within the DNA binding domain. Oxidative aggression could also be responsible for an inactivation of the transcription factor HSF1, which could explain the lowering of the iHSP70 expression in stressed hepatic tissue (Nciri et al. 2012). Under chronic stress conditions, the generation of H₂O₂ can affect the expression of cHSP70. This allows the chaperone to be translocated from the cytoplasm to the nucleus. Conversely, reduction in HSP70 expression can increase ROS generation and mitochondrial protein oxidation (Guo et al. 2007; Yan et al. 2002). Additional studies will be necessary by PCR (polymerase chain reaction) to confirm the exact mechanisms that relates the cirrhosis with HSP70 expression.

In conclusion, DEN induced cirrhosis in 7 weeks. The administration of DEN in rats developed cirrhosis quickly and efficiently with collagen deposition, and the resulting cirrhosis fairly homogeneous pattern and uniform among animals in both histological, biochemical, and molecular evaluations. Cirrhosis was developed under conditions of chronic cellular stress. This condition caused instability in the stress responsive system demonstrated by reduction in the expression of HSP70 protein, which results in increased generation of ROS and overexpression of iNOS, TGF- β 1, and α -SMA proteins, thus contributing to the development of hepatic fibrosis.

Acknowledgments This study was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS), and Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes (ULBRA).

Conflict of interest The authors of this article declare that they have no conflicts of interest.

References

- Adachi H, Katsuno M, Waza M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G (2009) Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia* 25:647–654
- Aleksunes LM, Goedken M, Manautou JE (2006) Up-regulation of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 during human liver injury. *World J Gastroenterol* 12:1937–1940
- Altrock E, Sens C, Wuerfel C, Vasel M, Kawelke N, Dooley S, Sottile J et al (2014) Inhibition of fibronectin deposition improves experimental liver fibrosis. *J Hepatol*
- AVMA (2007) AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). pp 1–39
- Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209–218
- Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, Xavier RM, Marroni NP (2012) Effect of antioxidant treatment

- on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol* 2012:1–7
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G (2013) Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 59:583–594
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Cameron J, Karunarete W (1936) Tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol* 42:1–21
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Chignard N, Housset C, Poupon R, Rosmorduc O (2002) Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol* 160:613–620
- Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhães R, de Mattos AA, Marroni CA, Zettler CG, Marroni NP (2001) Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation. *Arq Gastroenterol* 38:40–47
- Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655–1669
- Gomer CJ, Ryter SW, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Fisher AM (1996) Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Res* 56:2355–2360
- González-Ramos M, Calleros L, López-Ongil S, Raoch V, Griera M, Rodríguez-Puyol M, de Frutos S, Rodríguez-Puyol D (2013) HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- β 1 up-regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 45:232–242
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S (2002) Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7:d793–d807
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM (2007) Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 381:107–113
- Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H (2007) Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones* 12:245–254
- Gupta S, Deepti A, Deegan S, Lisbona F, Hetz C, Samali A (2010) HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1 α -XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol* 8:1–15
- Haratake J, Hisaoka M, Yamamoto O, Horie A (1991) Morphological changes of hepatic microcirculation in experimental rat cirrhosis: a scanning electron microscopic study. *Hepatology* 13:952–956
- Hooper PL, Hooper JJ (2005) Loss of defense against stress: diabetes and heat shock proteins. *Diabetes Technol Ther* 7:204–208
- Imaoka S, Osada M, Minamiyama Y, Yukimura T, Toyokuni S, Takemura S, Hiroi T, Funae Y (2004) Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett* 203:117–125
- Jacquier-Sarlin MR, Polla BS (1996) Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J* 318(Pt 1):187–193
- Jacquier-Sarlin MR, Jomot L, Polla BS (1995) Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J Biol Chem* 270:14094–14099
- Jiménez W, Clària J, Arroyo V, Rodés J (1992) Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 7:90–97
- Krause M, Rodríguez-Krause JC (2011) Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. *Med Hypotheses* 76:286–290
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Li Z, Chen X, Meng J, Deng L, Ma H, Csete M, Xiong L (2012) Ed50 and recovery times after propofol in rats with graded cirrhosis. *Anesth Analg* 114:117–121
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631–677
- Liu RM, Gaston Pravia KA (2010) Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 48:1–15
- Malik S, Bhatnagar S, Chaudhary N, Katare DP, Jain SK (2013) DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. *Protoplasma* 250:175–183
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994) Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17:235–248
- Mikami K, Otaka M, Goto T, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K et al (2004) Induction of a 72-kda heat shock protein and protection against lipopolysaccharide-induced liver injury in cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 19:884–890
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175
- Morimoto RI, Kroeger PE, Cotto JJ (1996) The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *EXS* 77:139–163
- Nciri R, Allagui MS, Bourogaa E, Saoudi M, Murat JC, Croute F, Elfeki A (2012) Lipid peroxidation, antioxidant activities and stress protein (HSP72/73, GRP94) expression in kidney and liver of rats under lithium treatment. *J Physiol Biochem* 68:11–18
- Rodríguez-Krause J, Krause M, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Murphy C, Newsholme P, Colleran G (2012) Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress Chaperones* 17:293–302
- Ross D (2004) Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug Metab Rev* 36:639–654
- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13:1392–1407
- Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC, Ross D (1997) The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol* 52:300–305
- Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoeng P, Berliner LJ, Ross D (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 65:1238–1247
- Sturgill MG, Lambert GH (1997) Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem* 43:1512–1526
- Swenberg JA, Hoel DG, Magee PN (1991) Mechanistic and statistical insight into the large carcinogenesis bioassays on N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res* 51:6409–6414
- Teufelhofer O, Parzefall W, Kainzbauer E, Ferik F, Freiler C, Knasmüller S, Elbling L, Thurman R, Schulte-Hermann R (2005) Superoxide generation from Kupffer cells contributes to hepatocarcinogenesis: studies on NADPH oxidase knockout mice. *Carcinogenesis* 26:319–329
- Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, Marroni NP, González-Gallego J (2009) Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* 139:1339–1346
- Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Alvarez M et al (2013) Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in

- rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 55:221–228
- Venugopal R, Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14960–14965
- Verma IM, Stevenson J (1997) I κ B kinase: beginning, not the end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11758–11760
- Vera L, Whysner J, Williams GM (1996) N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 71:57–81
- Wasser S, Lim GY, Ong CN, Tan CE (2001) Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 16:1244–1253
- Watanabe D, Otaka M, Mikami K, Yoneyama K, Goto T, Miura K et al (2004) Expression of a 72-kda heat shock protein, and its cytoprotective function, in gastric mucosa in cirrhotic rats. *J Gastroenterol* 39:724–733
- Yan LJ, Christians ES, Liu L, Xiao X, Sohal RS, Benjamin IJ (2002) Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *EMBO J* 21:5164–5172