

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**INVESTIGAÇÃO DO TRATAMENTO COM MELATONINA
EM CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO: AVALIAÇÃO DOS
FILAMENTOS DE ACTINA POR FLUORESCÊNCIA**

JULIANA CAVICCHIOLI MARTINS

**Botucatu
2025**

JULIANA CAVICCHIOLI MARTINS

**INVESTIGAÇÃO DO TRATAMENTO COM MELATONINA
EM CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO: AVALIAÇÃO DOS
FILAMENTOS DE ACTINA POR FLUORESCÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Física Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA

CO-ORIENTADORA: Ma ROBERTA CARVALHO CESÁRIO

**Botucatu
2025**

M386i

Martins, Juliana Cavicchioli

Investigação do tratamento com melatonina em células de câncer de ovário
: avaliação dos filamentos de actina / Juliana Cavicchioli Martins. -- Botucatu,
2025

25 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Física Médica) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa
Coorientadora: Ma. Roberta Carvalho Cesário

1. Melatonina. 2. Câncer de ovário. 3. Filamento de actina. 4. Viabilidade
celular. I. Título.

JULIANA CAVICCHIOLI MARTINS

**INVESTIGAÇÃO DO TRATAMENTO COM MELATONINA EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO: AVALIAÇÃO DOS
FILAMENTOS DE ACTINA POR FLUORESCÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Física Médica.

Botucatu, 28 de novembro de 2025.
(data da defesa)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa
Afiliações

Profa. Dra. Alana Rezende Godoi Rebeschini
Afiliações

Prof. Msc. Victória Mokarzel de Barros Camargo
Afiliações

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pela força e por iluminar meu caminho, mesmo nos momentos mais desafiadores desta trajetória.

À minha família, meu alicerce, agradeço pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma duvidei. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa**, agradeço pela orientação e pelo constante apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, que foram essenciais para o meu aprendizado e crescimento acadêmico.

À minha coorientadora, **Ma. Roberta Carvalho Cesário**, agradeço pela dedicação, paciência e pelas valiosas orientações que contribuíram de forma significativa para a realização deste estudo.

Ao laboratório em que realizei meu estágio, expresso minha sincera gratidão pela oportunidade de aprendizado e pelo ambiente de colaboração e troca que tanto contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao **PIBIC** pelo apoio e investimento fundamental no desenvolvimento desta pesquisa. A oportunidade de atuar como bolsista em 2024 foi essencial para meu crescimento acadêmico e científico, permitindo a construção deste trabalho e o aprofundamento na área de estudo.

Sou grata também a todas as pessoas que, de alguma forma, cruzaram meu caminho ao longo desta caminhada acadêmica. Algumas entraram por acaso, outras permaneceram como parte essencial da jornada, mas cada uma delas contribuiu, direta ou indiretamente, para que eu chegasse até aqui.

Dedico este trabalho à memória do meu avô, que partiu no início deste ano, mas que permanece vivo em meus pensamentos e em meu coração. Sua presença se faz constante em minhas lembranças, em seus ensinamentos e no amor que sempre me transmitiu. Cada linha desta monografia carrega um pouco da força, da sabedoria e da inspiração que recebi dele, e é com profunda gratidão e saudade que entrego esta conquista também a ele.

RESUMO

O câncer de ovário (CO) é a quinta maior causa de mortes por câncer entre as mulheres e a neoplasia ginecológica mais letal, dado sua detecção tardia, recorrência e metástase. Recentemente tem sido demonstrado que a melatonina, um hormônio secretado pela glândula pineal e pelas mitocôndrias das células, incluindo as células do CO, pode atuar como uma potencial terapia contra o câncer devido às suas funções antioxidantes, imunomodulatórias, antiangiogênicas e pró-apoptóticas em modelos *in vitro* e *in vivo*. Portanto, o objetivo do presente estudo é investigar as concentrações de melatonina sobre a inibição do crescimento celular em duas linhagens de células de câncer de ovário (SKOV-3 e OVCAR-3) e quantificar e qualificar os filamentos de actina dessas células por fluorescência. Para isso, foram conduzidos estudos *in vitro* para caracterização dos ensaios de MTT, a fim de avaliar a melhor concentração capaz de inibir o crescimento em 50% (IC₅₀) das células tumorais, utilizando diferentes concentrações e períodos de exposição com melatonina, padronização do protocolo para investigação dos filamentos de actina por fluorescência e, finalmente, avaliação quantitativa e qualitativa desses filamentos após os tratamentos. Os níveis de melatonina também foram quantificados, considerando que sua concentração costuma estar reduzida em determinadas células tumorais. Por meio dessas análises, buscou-se avaliar o potencial terapêutico da melatonina na inibição do crescimento das células de câncer de ovário e na modulação da organização dos filamentos de actina. Os resultados demonstraram que a melatonina promove uma redução concentração-dependente na viabilidade das linhagens OVCAR-3 e SKOV-3, com valores de IC₅₀ de 5,47 mM e 6,42 mM, respectivamente. O ensaio de ELISA indicou um aumento significativo dos níveis intracelulares de melatonina após 24 horas de exposição a 3 mM. A microscopia de fluorescência evidenciou desorganização progressiva dos filamentos de actina e alterações morfológicas associadas à retração celular, perda de adesão e possível indução de morte celular. Assim, conclui-se que a melatonina exerce um efeito citotóxico e pró-apoptótico nas células de câncer de ovário, reforçando seu potencial como agente antitumoral promissor e destacando sua relevância para o desenvolvimento de terapias complementares contra o câncer de ovário.

Palavras-chave: Câncer de Ovário, Melatonina, Viabilidade celular, Filamento de Actina.

ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the fifth leading cause of cancer-related deaths among women and the most lethal gynecological malignancy, due to its late detection, recurrence, and metastasis. Recently, it has been demonstrated that melatonin, a hormone secreted by the pineal gland and by the mitochondria of cells, including OC cells, may act as a potential anticancer therapy due to its antioxidant, immunomodulatory, antiangiogenic, and pro-apoptotic properties in *in vitro* and *in vivo* models. Therefore, the present study aims to investigate the effects of different melatonin concentrations on the inhibition of cell growth in two OC cell lines (SKOV-3 and OVCAR-3) and to quantify and characterize the actin filaments of these cells by fluorescence microscopy. For this purpose, *in vitro* studies were conducted to characterize MTT assays in order to determine the concentration capable of inhibiting 50% of tumor cell growth (IC_{50}), using different melatonin concentrations and exposure times, standardizing the protocol for actin filament investigation by fluorescence, and finally performing quantitative and qualitative evaluation of actin filaments after treatment. Melatonin levels were also quantified, considering that its concentration is often reduced in certain tumor cells. Through these analyses, the study sought to evaluate the therapeutic potential of melatonin in inhibiting OC cell growth and modulating actin filament organization. The results demonstrated that melatonin promotes a concentration-dependent reduction in the viability of OVCAR-3 and SKOV-3 cell lines, with IC_{50} values of 5.47 mM and 6.42 mM, respectively. The ELISA assay indicated a significant increase in intracellular melatonin levels after 24 hours of exposure to 3 mM. Fluorescence microscopy revealed progressive disorganization of actin filaments and morphological alterations associated with cell retraction, loss of adhesion, and possible induction of cell death. Thus, we concluded that melatonin exerts cytotoxic and pro-apoptotic effects on OC cells, reinforcing its potential as a promising antitumor agent and highlighting its relevance for the development of complementary therapies against OC.

Keywords: Ovarian Cancer, Melatonin, Cell Viability, Actin Filaments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos antitumorais e potencial adjuvante da melatonina no câncer de ovário	10
Figura 2 – Representação esquemática do delineamento experimental	14
Figura 3 – Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com melatonina em diferentes concentrações (OVCAR-3)	16
Figura 4 – Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com melatonina em diferentes concentrações (SKOV-3)	17
Figura 5 – Concentração Intracelular de Melatonina	17
Figura 6 - Imagens de fluorescência das linhagens de câncer de ovário OVCAR-3 e SKOV-3 nas condições controle e tratadas com melatonina (3 mM e 6 mM)	18

Sumário

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
Lista de Figuras	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Câncer de Ovário: Aspectos Gerais.....	9
1.2 Câncer de Ovário e o Tratamento com Melatonina.....	10
1.2 Relação do Filamento de Actina com o Câncer de Ovário e Melatonina.....	12
2. OBJETIVO GERAL	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
3. METODOLOGIA.....	13
3.1 Linhagens celulares de câncer de ovário	13
3.2 Delineamento Experimental	14
3.3 Ensaio de Citotoxicidade (MTT).....	15
3.4 Análise dos filamentos de actina por fluorescência.....	15
3.5 Determinação dos níveis de melatonina	15
3.5 Análise estatística dos dados	16
4. RESULTADOS	16
5. Discussão.....	19
6. Conclusão	22
REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Câncer de Ovário: Aspectos Gerais*

O câncer de ovário (CO) é a neoplasia ginecológica mais letal e a quinta principal causa de mortes por câncer entre as mulheres. Isso se deve principalmente a sua detecção tardia, recorrência local e metástase (ZHANG et al., 2017). Após décadas de estudo, a progressão do tumor associada à metástase continua sendo a principal causa de mortalidade em pacientes com CO (CHU et al., 2020). A taxa de cura é superior a 90% em pacientes com câncer restrito ao ovário, no entanto, como os primeiros sintomas são frequentemente confundidos com intestino irritado ou síndrome pré-menstrual, 61% das pacientes são diagnosticadas em estágio avançado (RICHARDSON, 2019).

No Brasil, eram esperados 6.650 novos casos de câncer de ovário para o triênio 2020-2022, correspondendo a um risco estimado de 6,18 novos casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020). Os principais fatores de risco associados ao CO incluem: idade reprodutiva e histórico familiar de CO e de mama (alterações genéticas). Além disso, aspectos reprodutivos e hormonais, como menarca precoce e menopausa tardia, bem como condições como obesidade e tabagismo, também contribuem para o aumento do risco da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019a; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Os fatores de risco para o câncer de ovário podem ser classificados em não modificáveis, como predisposição genética e idade, e modificáveis, como fatores hormonais e reprodutivos. Entre os fatores genéticos, destacam-se as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, associadas à síndrome hereditária do câncer de mama e ovário (HBOC), e a síndrome de Lynch, relacionada a mutações em genes de reparo de DNA. Estudos de menor escala têm indicado uma associação entre a ingestão de fibras alimentares e a prevalência do câncer de ovário. HUANG e colaboradores (2018) observaram que o aumento do consumo de fibras está relacionado a uma redução significativa na incidência da doença. Além disso, evidências apontam que uma dieta rica em soja pode contribuir para a diminuição do risco de câncer epitelial de ovário. Outro fator relevante é o status vitamínico: níveis reduzidos de vitamina D têm sido associados a um risco aumentado para o desenvolvimento desse tipo de câncer (GUO et al., 2018). Mulheres de ascendência franco-canadense, holandesa e islandesa apresentam maior prevalência de mutações associadas ao câncer de ovário (STEWART, 2019).

Segundo SMOLARZ et al. (2025), cerca de 95% dos cânceres ovarianos se originam do epitélio do órgão e apresentam diversidade molecular, sendo divididos em dois tipos.

O tipo I é de baixo grau, representa 25% dos casos e inclui carcinomas serosos, endometrioides, mucinosos e de células claras, geralmente a partir de tumores borderline. Caracteriza-se por crescimento lento e bom prognóstico, com sobrevida em cinco anos de aproximadamente 55% (SMOLARZ et al., 2025).

O tipo II é de alto grau e baixa maturidade, corresponde a 75% dos casos, originando-se possivelmente da porção distal da trompa uterina. Apresenta mutações em p53, aproximadamente 90% e BRCA, crescimento rápido e curso agressivo, sendo detectado tardiamente, com sobrevida em cinco anos inferior a 30% (SMOLARZ et al., 2025).

Ainda conforme os autores, os cânceres ovarianos podem ser classificados molecularmente e por estágio anatômico, mas devido à heterogeneidade tumoral, nem toda paciente se enquadra exatamente. Cinco grupos principais são reconhecidos:

- (1) Carcinomas serosos de alto grau;
- (2) Carcinomas endometrioides;
- (3) Carcinomas de células claras (frequentemente associados à endometriose);
- (4) Carcinomas mucinosos;
- (5) Carcinomas serosos de baixo grau (SMOLARZ et al., 2025).

As estratégias terapêuticas iniciais para o câncer de ovário geralmente envolvem a realização da citorredução cirúrgica combinada à quimioterapia (JESSMON et al., 2017). O tratamento quimioterápico padrão baseia-se, predominantemente, na utilização de agentes derivados da platina e/ou do taxol (HSIEH et al., 2019). Entretanto, a marcada heterogeneidade tumoral característica desse tipo de câncer representa um desafio significativo para a definição da terapêutica mais adequada. Além disso, a diversidade histológica dos tumores está associada ao desenvolvimento de resistência adquirida à quimioterapia em muitos casos (ROJAS et al., 2016). Essa resistência constitui um fator crítico para a sobrevida das pacientes diagnosticadas em estágios avançados, sendo responsável por falhas terapêuticas em cerca de 90% dos casos e, conseqüentemente, pelo aumento das taxas de mortalidade (LONGLEY; JOHNSTON, 2005).

1.2 Câncer de Ovário e o Tratamento com Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina que desempenha múltiplas funções fisiológicas e biológicas. Produzida pela glândula pineal e por diversos

tecidos extra pineais, ela participa da regulação de processos celulares essenciais e apresenta propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antitumorais (MAROUFI et al., 2020; SONG et al., 2017). Seus efeitos podem ocorrer de maneira dependente ou independente dos receptores de membrana MT1 e MT2; em determinados tipos tumorais, sua ação oncostática está associada principalmente à ativação do receptor MT1 (MAROUFI et al., 2020; GURUNATHAN et al., 2021).

Os receptores de melatonina são membros da família de receptores acoplados à proteína G e são ativados por ligantes como melatonina, N-acetilserotonina e outros agentes (SIEGEL et al., 2022). A ativação dos receptores de melatonina provoca o descolamento da proteína G heterotrimérica, e as subunidades formadas interagem com moléculas efetoras relacionadas à sinalização celular (CECON et al., 2017).

Além disso, as atividades receptor-independentes da melatonina também têm potenciais interações com as células tumorais quando entram no citosol através de dois transportadores diferentes, ou seja, o transportador de glicose 1 (GLUT1) e os transportadores peptídicos humanos 1 e 2 (PEPT1/2) (TAN et al., 2016; OSTRIN, 2019; TALIB, 2018). Muitos estudos usando diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de ovário, documentaram os efeitos antitumorais e oncostáticos da melatonina em experimentos *in vivo* e *in vitro* (LIN et al., 2020; HEVIA et al., 2015; HUO et al., 2017). A Figura 1 ilustra alguns processos pelos quais a melatonina exerce ação inibitória sobre importantes mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer de ovário (CHUFFA et al., 2017).

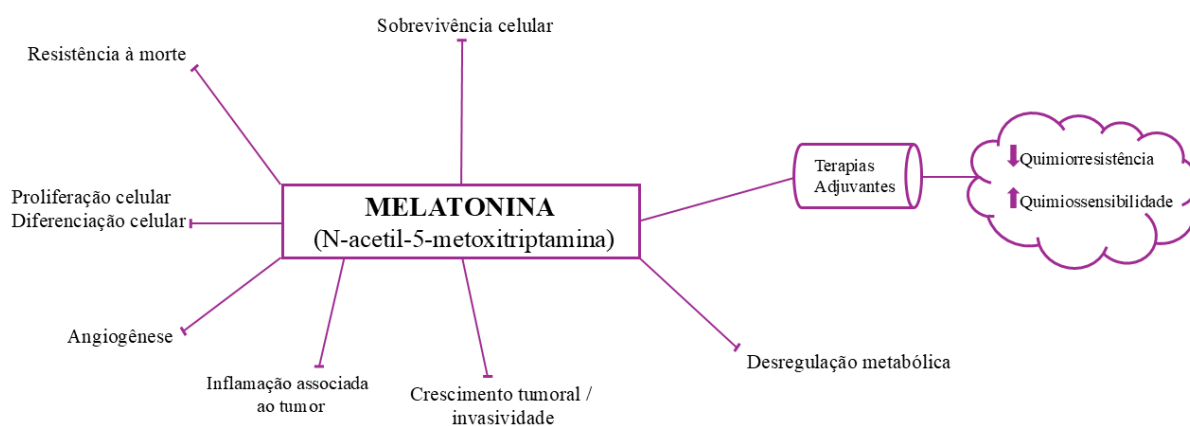


Figura 1: Resumo de processos pelo qual a melatonina exerce ação inibitória sobre importantes mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer de ovário (CO). Esperam-se também efeitos adicionais da melatonina quando administrada em conjunto com outros quimioterápicos padrões (por exemplo, compostos de platina e derivados do taxol), reduzindo assim a resistência e melhorando a quimiossensibilidade ao tratamento. Adaptado de CHUFFA et al. (2017).

1.3 Relação do Filamento de Actina com o Câncer de Ovário e Melatonina

A actina é uma das proteínas mais abundantes em células eucarióticas e desempenha um papel central em muitas funções biológicas, tais como motilidade celular, contração muscular, adesão, divisão celular, formação de junções, protrusão da membrana celular, tráfego de vesículas, remodelação da cromatina e manutenção da integridade física da célula (BARDA-SAAD et al., 1997; VAN DEN ENT et al., 2001; HALL, 1998; POLLARD et al., 2009). O citoesqueleto da actina é composto por actina globular monomérica (G-actina), que se polimeriza em um filamento polimérico conhecido como actina filamentosa (F-actina). O passo de alongamento da F-actina é energeticamente favorável; no entanto, o primeiro passo desse processo, conhecido como "nucleação", é energeticamente desfavorável e, portanto, altamente regulado (SEPT et al., 2001). Após a nucleação, ocorre o alongamento, com a dinâmica da actina regulada por proteínas envolvidas no corte, despolimerização, capeamento e funções motoras (POLLARD et al., 2009).

Diferentes configurações do citoesqueleto da actina levam à criação de múltiplas estruturas distintas que afetam a morfologia e a migração das células. Estes podem ser categorizados aproximadamente como redes ramificadas de actina, redes cruzadas e feixes de actina (BLANCHONIN et al., 2014). Células metastáticas são caracterizadas por microfilamentos mal estruturados e pouca fixação ao seu substrato. Em contraste, células de baixa invasividade, se fixam ao substrato através de contatos de adesão focal formados por fibras de estresse de actina, e são unidas por proteínas de adesão como integrinas e caderinas, entre outras proteínas (RAZ et al., 1982).

As células cancerosas, portanto, dependem de estruturas citoesqueléticas canônicas de actina para migração e disseminação metastática (MIERKE, 2013). Para penetrar no tecido local ou distante e escapar do tumor primário, as células cancerosas também fazem uso de estruturas especializadas de actina chamadas invadopodia. Essas protuberâncias consistem em filamentos de actina ramificados e não ramificados, e sua formação é facilitada através da atividade Arp2/3 e Formina (LIZÁRRAGA et al., 2009; SCHOUMACHER et al., 2010). A desregulação da dinâmica da actina pode direcionar sua montagem para arquiteturas específicas, favorecendo invasão e metástase. Além disso, o turnover da G-actina, normalmente distribuído entre diferentes reguladores, pode ser redirecionado para um regulador predominante durante a progressão tumoral (OLSON et al., 2009).

Inúmeros grupos de pesquisa têm relatado os efeitos antitumorais da melatonina em diferentes tipos de neoplasias, incluindo células tumorais de ovário (FUTAGAMI et al., 2001). Essa indolamina é capaz de inibir o crescimento celular por diversos mecanismos, seja

promovendo o bloqueio do ciclo celular em determinados estágios, atuando como antagonista de moléculas pró-tumorigênicas, como o estradiol no câncer de mama, ou ainda impedindo a ativação do receptor de andrógeno no câncer de próstata (BLASK et al., 1986; ČMIELOVÁ et al., 2011; RIMLER et al., 2002).

Além disso, a melatonina apresenta efeitos pró-apoptóticos, associados à inativação do NF- κ B e ao aumento de citocinas como a IL-6 (SAINZ et al., 2005). Apesar desses avanços, a influência da melatonina sobre a organização dos filamentos de actina em células de câncer de ovário ainda não foi investigada, representando um aspecto relevante para compreender seus possíveis efeitos na dinâmica celular e no comportamento metastático.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar as concentrações de melatonina sobre a inibição do crescimento celular em duas linhagens de câncer de ovário e quantificar e qualificar os filamentos de actina nessas células após o tratamento.

2.1 Objetivos específicos

Neste projeto, utilizamos duas linhagens de células de câncer de ovário (SKOV-3 e OVCAR-3). A partir destes dados, o projeto apresenta os seguintes objetivos:

- Caracterização dos ensaios de MTT para avaliar a melhor concentração capaz de inibir o crescimento em 50% (IC50) das células tumorais;
- Utilizar diferentes concentrações e períodos de exposição a melatonina;
- Avaliar os filamentos de actina das células tumorais por quantificação e intensidade de fluorescência após os tratamentos com melatonina.

3. METODOLOGIA

3.1 Linhagens celulares de câncer de ovário

Foram utilizadas duas linhagens celulares de carcinoma ovariano humano: a SKOV-3, uma linhagem de alto grau de malignidade do tipo II, originária de adenocarcinoma resistente às quimioterapias convencionais contra o CO e que vem sendo utilizada em diversos experimentos com diferentes tratamentos e a OVCAR-3 derivada do subtipo de carcinoma seroso de alto grau.

As células SKOV-3 (ATCC® HTB-77) obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) estão acondicionadas em nosso laboratório no IBB/UNESP. As células OVACAR-3 foram adquiridas do banco de células do rio de janeiro, sendo previamente validadas por RTqPCR. O cultivo das células ocorreu em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco, Nova York, EUA), suplementado com 10% de SFB e 1% AA a 37° C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Regularmente, as células são expandidas em frascos-T de 75 cm² (Costar, Cambridge, MA, EUA), com troca de 50% do meio de cultura base a cada dois dias. O sobrenadante da cultura celular foi aspirado e quando obtivemos confluência de 90%, as células foram incubadas com tripsina/EDTA 0,25% (T4049-500ML – Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), para o bloqueio de sua aderência ao frasco de cultura. Após a centrifugação, as células foram lavadas em meio de cultura, ressuspensas e/ou criopreservadas a -80° C.

3.2 Delineamento Experimental

Para avaliar os efeitos da melatonina (Mel) sobre a cultura de células cancerosas de ovário (SKOV-3 e OVCAR-3), foram conduzidos experimentos com base nos seguintes grupos para cada linhagem celular envolvendo diferentes concentrações e períodos de exposição:

- A) Grupo Controle [meio padrão RPMI + veículo dimetilsufóxido (DMSO)];
- B) Grupo Melatonina (Mel) + DMSO;

A Figura 2 ilustra os grupos controle e tratados com melatonina para ambas as linhagens OVCAR-3 e SKOV-3 de câncer de ovário.

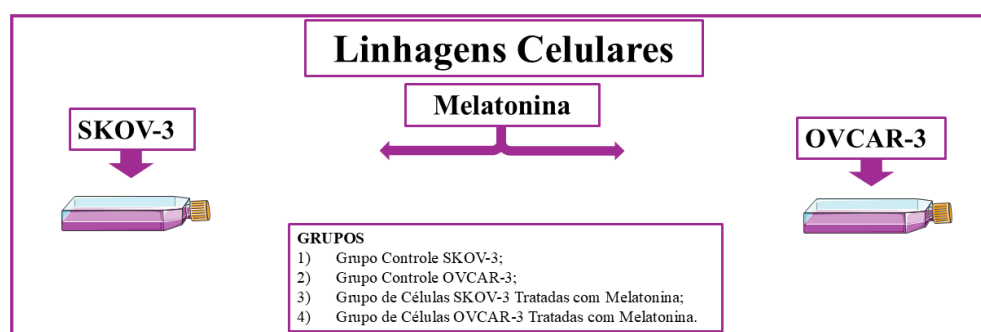


Figura 2: Esquema ilustrativo do tratamento com melatonina e planejamento experimental dos grupos de análise.

3.3 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

As células SKOV-3 e OVCAR-3 após cada situação experimental foram semeadas a uma concentração de $5,0 \times 10^3$ em placas de 96 poços. Após 24 h de tratamento, a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e a presença dos cristais de formazan foi avaliada através de leitor de microplaca (Epoch) a 550 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada com base no grupo controle sem tratamento.

3.4 Análise dos filamentos de actina por fluorescência

Após o período de tratamento das células de câncer de ovário, as células foram fixadas com metanol e submetidas ao protocolo de coloração fluorescente para faloidina-iFluor 488 (ab176753). Em seguida, foram permeabilizadas e coradas com DAPI para marcação dos núcleos (azul) e com um marcador específico para receptores de melatonina tipo 1 (MT1R) (vermelho). A combinação desses corantes permitiu a visualização dos filamentos de actina em verde, dos núcleos em azul e dos receptores de melatonina em vermelho, possibilitando a análise da organização celular sob diferentes condições de tratamento.

A visualização das amostras foi realizada em um microscópio de fluorescência confocal (Leica TCS SP8, Leica *Microsystems*), utilizando diferentes ampliações e os softwares Leica X e Las X Office (Leica *Microsystems*) para a aquisição e análise das imagens. Foram empregados o filtro verde (excitação: 490 nm; emissão: 520 nm) e o filtro azul (DAPI). As fotomicrografias obtidas em cada canal foram posteriormente combinadas no software ImageJ, possibilitando a avaliação qualitativa dos padrões de organização da actina.

3.5 Determinação dos níveis de melatonina

A concentração de melatonina foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando o kit comercial E-EL-H2016 da Elabscience® (Houston, EUA), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Trata-se de um ELISA do tipo sanduíche competitivo, específico para a detecção de melatonina em amostras biológicas.

As amostras e os padrões foram distribuídos em placas previamente revestidas com anticorpos específicos para melatonina. Após a adição dos reagentes, a placa foi incubada em temperatura ambiente, permitindo a ligação competitiva entre a melatonina presente nas amostras e o conjugado enzimático. Em seguida, lavagens sucessivas foram realizadas para remover reagentes não ligados.

A reação foi revelada pela adição do substrato cromogênico TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), resultando em desenvolvimento de cor proporcional à quantidade de melatonina ligada. A reação foi interrompida com solução de parada e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplacas a 450 nm.

A concentração de melatonina nas amostras foi determinada a partir de uma curva padrão gerada por regressão dos valores de absorbância dos padrões fornecidos com o kit.

3.5 Análise estatística dos dados

As variáveis foram estudadas através da análise de variância (One-way ANOVA) complementados com o teste de comparações múltiplas de “Tukey” executados no software *GraphPad Prism 9* (GraphPad Software, Inc.; CA, EUA). Para os dados não-paramétricos, será utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* complementado com o teste de *Dunn*. Análises envolvendo dois grupos de comparação serão avaliados com test t não pareado. Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP e apresentados em tabelas e gráficos, considerando-se 5% de significância ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Efeitos da melatonina sobre a viabilidade celular e seus níveis intracelulares em células de carcinoma ovariano (linhagens OVCAR-3 e SKOV-3).

A análise de viabilidade celular revelou uma redução significativa na sobrevivência das células após 24 horas de exposição à melatonina. Para a linhagem OVCAR-3, concentrações entre 4 mM e 7 mM resultaram em queda expressiva da viabilidade, enquanto na linhagem SKOV-3 o efeito foi observado entre 5 mM e 7 mM (Figuras 3A e 4A).

De modo geral, os resultados mostram que a citotoxicidade aumenta conforme a concentração do composto, indicando um possível efeito inibitório da melatonina sobre a proliferação celular em ambas as linhagens.

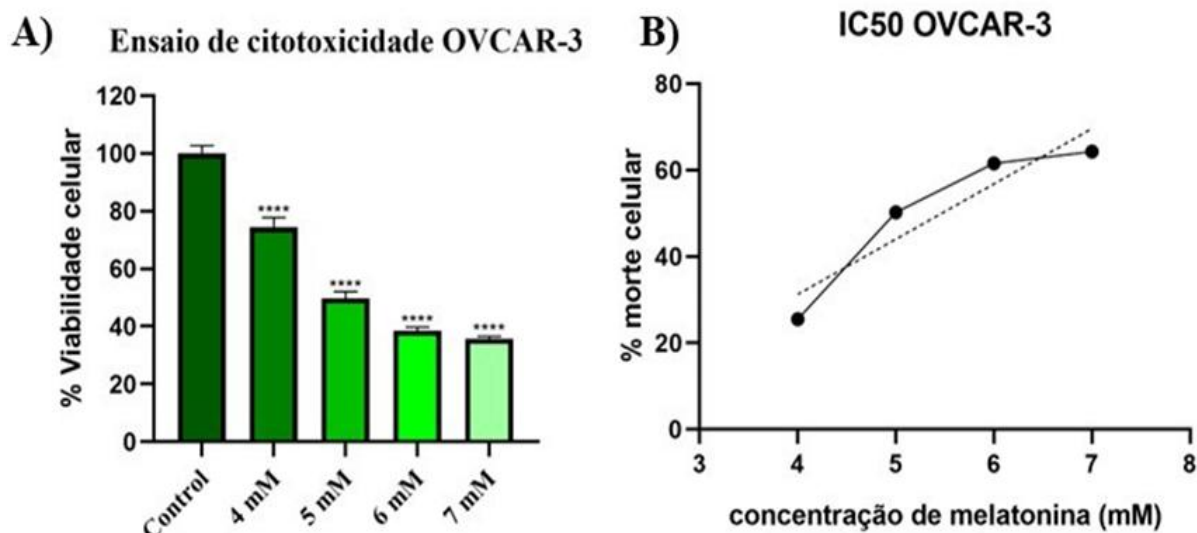


Figura 3: Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com melatonina em diferentes concentrações. **(A)** O gráfico mostra os efeitos da melatonina nas concentrações de 4 mM, 5 mM, 6 mM e 7 mM na linhagem OVCAR-3. **(B)** Representação gráfica da IC50 (Concentração Inibitória de 50%) da melatonina para a linhagem OVCAR-3. *Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Valores analisados por One-Way ANOVA.

Diante disso, foi determinada a Concentração Inibitória de 50% (IC_{50}) para ambas as linhagens, sendo de 5,47 mM para OVCAR-3 e 6,42 mM para SKOV-3 (Figuras 3B e 4B). Para os experimentos subsequentes, a concentração de 6 mM foi adotada como referência por se situar entre os valores de IC_{50} obtidos. Adicionalmente, a concentração de 3 mM também foi empregada com o objetivo de investigar os efeitos da melatonina em níveis subcitotóxicos.

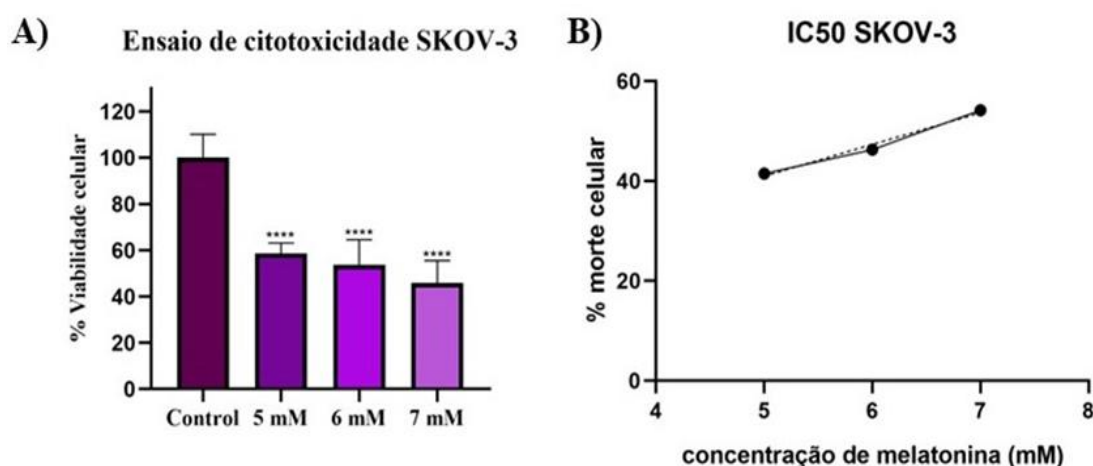


Figura 4: Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com melatonina em diferentes concentrações. **(A)** Gráfico representando a viabilidade celular da linhagem SKOV-3 após exposição a 4 mM, 5 mM, 6 mM e 7 mM de melatonina. **(B)** Representação gráfica da IC50 (Concentração Inibitória de 50%) da melatonina para a linhagem SKOV-3. *Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Valores analisados por One-Way ANOVA.

A quantificação por ELISA evidenciou um aumento significativo da concentração intracelular de melatonina após 24 horas de tratamento com 3 mM do composto nas linhagens OVCAR-3 e SKOV-3, quando comparadas ao grupo controle tratado apenas com o veículo (Figuras 5A e 5B).

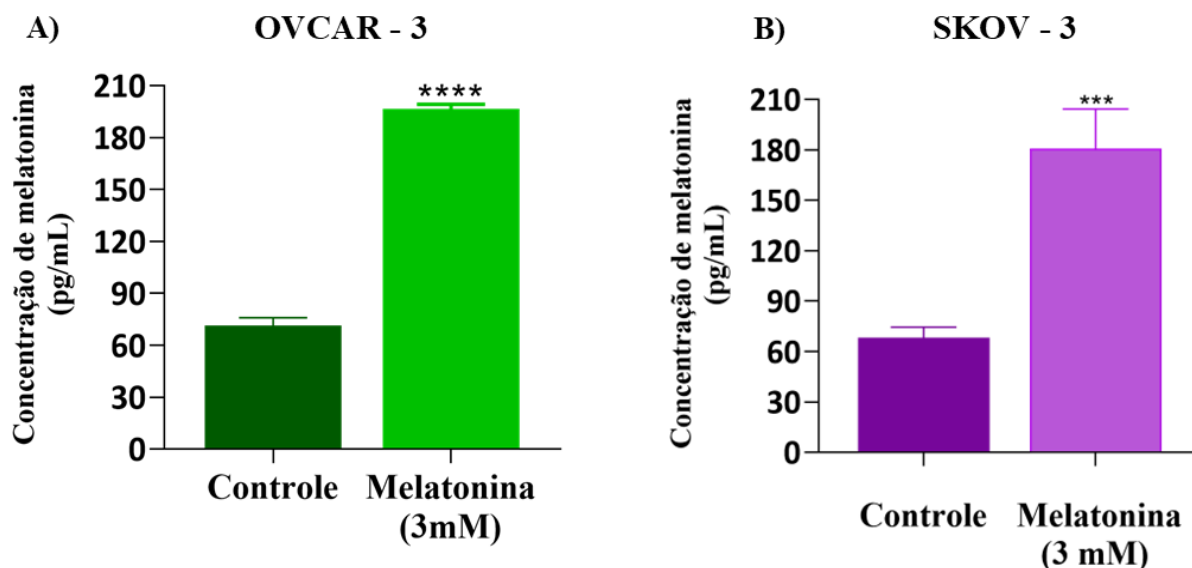


Figura 5: Concentração intracelular de melatonina. **A)** Concentração de melatonina em células de câncer de ovário linhagem OVCAR-3. **B)** Concentração de melatonina em células de câncer de ovário linhagem SKOV-3. Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$). Test t Student.

Microscopia de fluorescência avaliou os efeitos da melatonina sobre os filamentos de actina em células de câncer de ovário (linhagens OVCAR-3 e SKOV-3).

A microscopia de fluorescência evidenciou alterações progressivas na organização do citoesqueleto de actina em resposta ao tratamento (Figura 6). Nas células OVCAR-3, o grupo controle apresentava fibras de estresse espessas, bem definidas e paralelamente organizadas, distribuídas ao longo de todo o citoplasma, indicando morfologia aderente e arquitetura citosquelética estável. No tratamento com 3 mM, observou-se redução na densidade e no paralelismo das fibras, com estrutura mais fragmentada e menos tensionada, sugerindo início de desorganização do citoesqueleto e perda parcial da adesão celular. Já em 6 mM, as fibras de actina estavam ausentes, e as células apresentavam morfologia arredondada, pouca adesão ao substrato e retração evidente.

Nas células SKOV-3, o controle demonstrou fibras de actina bem definidas, distribuídas tanto na região central quanto na periferia celular, evidenciando organização estrutural equilibrada. Em concentração de 3 mM de melatonina, ocorreu desorganização evidente das fibras, acompanhada do aparecimento de prolongamentos citoplasmáticos irregulares e perda de alinhamento, indicando alterações na dinâmica da actina e modificação da morfologia celular. No tratamento com 6 mM, observou-se predominância de actina cortical, concentrada na periferia celular, associada à retração pronunciada e formato celular mais esférico, sugerindo perda da integridade estrutural e diminuição da adesividade.

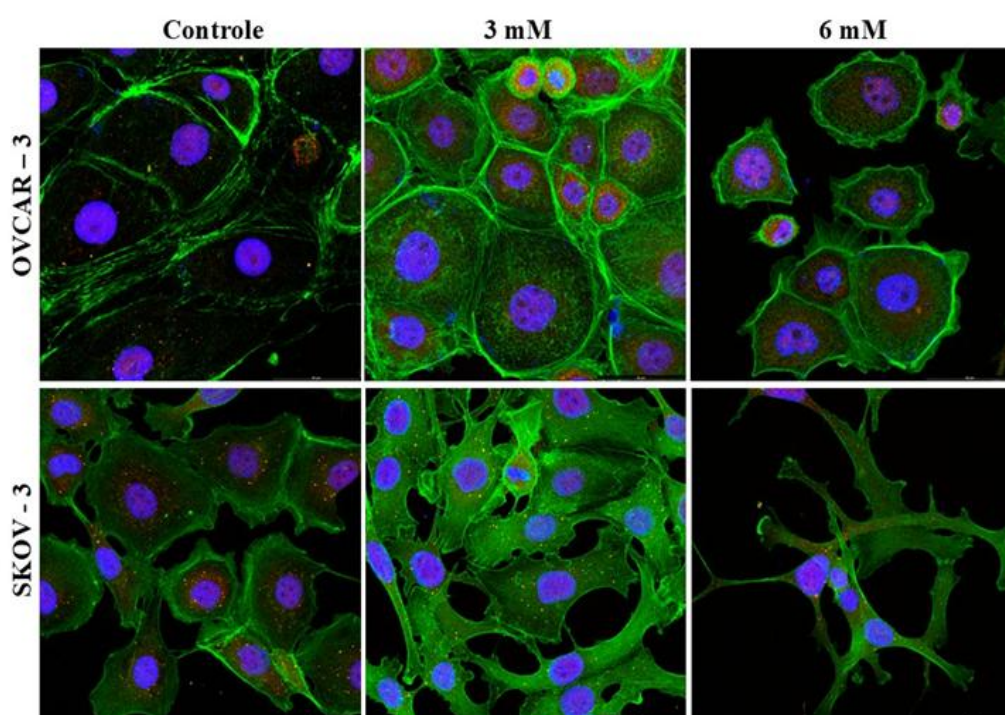


Figura 6: Imagens de fluorescência das linhagens de câncer de ovário OVCAR-3 e SKOV-3 nas condições controle e tratadas com melatonina (3 mM e 6 mM). Filamentos de actina estão marcados em verde, núcleos em azul e receptores de melatonina tipo 1 em vermelho.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos da melatonina em células ovarianas humanas das linhagens OVCAR-3 e SKOV-3. Apesar dos notáveis avanços nos tratamentos do câncer de ovário, como quimioterapia e imunoterapia, essa neoplasia ainda apresenta alta taxa de mortalidade (WHO, 2022).

As células tumorais possuem a capacidade de desenvolver diversas estratégias metabólicas, o que contribui para a promoção e o avanço do crescimento tumoral (YIN et al.,

2022). Portanto, a investigação dessas modificações metabólicas pode fornecer informações essenciais para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de ovário, ampliando as opções terapêuticas e melhorando as perspectivas de tratamento.

A partir do teste de viabilidade celular, observou-se que concentrações entre 4 mM e 7 mM de melatonina nas células OVCAR-3 foram suficientes para reduzir significativamente a viabilidade celular. Concentrações entre 5 mM e 7 mM também reduziram a viabilidade das células SKOV-3, com valores de IC₅₀ de 5,47 mM para OVCAR-3 e 6,42 mM para SKOV-3.

Na literatura científica, diversos estudos *in vitro* investigaram os efeitos da melatonina em diferentes concentrações sobre células cancerígenas, demonstrando que esse hormônio exerce atividade antiproliferativa e citotóxica de forma dependente da dose e do tempo, com variações conforme o tipo celular e as condições experimentais (HSIAO et al., 2022; GHORBANI-ANARKOOLLI et al., 2021).

Os achados de Akbarzadeh et al. (2021) mostraram que a melatonina exerce efeito inibitório sobre células SKOV-3 de carcinoma ovariano humano, com uma IC₅₀ de 3,4 mM após 48 horas de incubação, reforçando seu potencial como agente antitumoral. De forma complementar, Kim et al. (2012) investigaram a ação da melatonina em células epiteliais ovarianas normais e em células SKOV-3, observando que, após 24 horas de incubação com concentrações entre 0,5 e 2 mM, houve uma redução de aproximadamente 15% na viabilidade das células tumorais, enquanto as células normais apresentaram leve aumento na viabilidade. Esses resultados sugerem um efeito seletivo da melatonina, promovendo a inibição do crescimento de células cancerígenas sem comprometer células saudáveis.

Em células de câncer de ovário OVCAR-3, a IC₅₀ foi de 4,8 mM (BAGHAL-SADRIFOROUGH et al., 2022). Um estudo demonstrou que concentrações elevadas de melatonina (0,6 a 28 mM) reduziram significativamente a viabilidade de células de câncer de tireoide anaplásico a partir de 4 mM. Em concentrações de 16 e 28 mM, além da citotoxicidade acentuada, observou-se inibição da formação de colônias, sugerindo morte reprodutiva e destacando o potencial da melatonina como agente antitumoral (GHORBANI-ANARKOOLLI et al., 2021).

Em síntese, a melatonina demonstra potencial como agente antiproliferativo e citotóxico, com efeitos dependentes da concentração e do tipo celular, sugerindo sua aplicabilidade em terapias combinadas contra o câncer.

A melatonina exerce efeitos distintos em células normais e tumorais. Em células normais, atua predominantemente como um potente antioxidante, protegendo contra o estresse oxidativo. Em contrapartida, nas células tumorais, seu efeito é oposto: a melatonina pode

apresentar ações pró-oxidantes, pró-apoptóticas e antiangiogênicas, contribuindo para a inibição da proliferação e da sobrevivência celular (TALIB, 2018; REITER et al., 2020).

Além disso, a produção endógena de melatonina é reduzida em células tumorais quando comparadas às células normais. Esse padrão foi demonstrado por CUCIELO et al. (2022), que observaram baixa concentração de melatonina em células SKOV-3, tanto em relação ao tecido ovariano normal quanto em comparação às mesmas células tratadas com o hormônio. Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo, reforçando a hipótese de que a melatonina exógena pode restaurar níveis intracelulares e modular processos metabólicos e oxidativos associados à progressão tumoral.

O câncer também decorre de alterações genéticas progressivas que conferem às células malignas propriedades aprimoradas, conhecidas como “marcas registradas do câncer” (HALL, 2009), muitas das quais dependem da organização do citoesqueleto de actina (HALL, 2009). Entre os processos centrais para a malignidade estão a invasão tecidual e a metástase, que exigem remodelação dinâmica do citoesqueleto e capacidade migratória das células tumorais (OLSON et al., 2009; SHOHAM et al., 2001).

Dessa forma, a dinâmica do citoesqueleto de actina é crucial para a invasão e metástase, controlando morfologia, motilidade e geração de forças contráteis. Esse processo depende de proteínas de ligação à actina (ABPs), concentrações de cálcio e ATP, sinalização de cinases e fosfatases, além de fatores ambientais como pH e temperatura (YAMAGUCHI et al., 2007; JIA et al., 2014).

Alterações na actina e nas ABPs são observadas nos estágios iniciais do câncer e estão intimamente ligadas à transição epitelial-mesenquimal (EMT), que permite às células epiteliais adquirir propriedades migratórias e invasivas (HANAHAHAN, 2022). Durante a EMT, as ABPs estabilizam os filamentos de actina, promovem a formação de pseudópodes e reorganizam a rede citoesquelética. A despolarização inicial da actina contribui para a perda da polaridade celular, enquanto a extensão de filopódios facilita a migração e invasão das células tumorais (BEAR et al., 2002). Além disso, alterações em ABPs e proteínas associadas ao envelope nuclear estão ligadas à progressão tumoral, invasão, metástase e resistência a drogas. Por exemplo, a redução de nesprina-1 foi observada em diferentes tipos de câncer, mas sua superexpressão reverte o fenótipo maligno na linhagem Huh7 de câncer de fígado humano, evidenciando a importância da actina e das ABPs nesse contexto tumoral. Essas interações demonstram que a actina, tanto no citoplasma quanto no núcleo, é central para processos críticos da carcinogênese e representa um potencial alvo terapêutico (SUR-ERDEM et al., 2019).

Estudos já relataram que a metastatização do câncer envolve células tumorais móveis que atravessam barreiras teciduais e se disseminam pelo corpo, processo dependente da reorganização do citoesqueleto de actina. No presente estudo, o padrão observado, com fibras bem definidas nas células controle e perda progressiva dessas estruturas nos grupos tratados, sugere ação pró-apoptótica da melatonina, interferindo na integridade estrutural da célula, assim como observado por ALVAREZ-ARTIME et al. (2020) em células de melanoma. Estudos anteriores demonstraram que a melatonina pode ativar vias mitocondriais de apoptose, incluindo liberação de citocromo c, aumento da razão Bax/Bcl-2 e ativação de caspase-3, e essas alterações estão frequentemente associadas à desestruturação do citoesqueleto de actina (TALIB, 2018; CHENG et al., 2023).

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a melatonina promove redução concentração-dependente da viabilidade celular em linhagens de câncer de ovário, com IC₅₀ em torno de 5,5 a 6,4 mM. O aumento significativo dos níveis intracelulares de melatonina nas células tratadas, aliado às alterações morfológicas observadas por fluorescência, como desorganização do citoesqueleto de actina, retração celular e perda de adesão, reforça seu potencial efeito citotóxico e pró-apoptótico, sustentando seu papel como agente antitumoral promissor.

REFERÊNCIAS

ACTIN cytoskeleton in cancer progression and metastasis – Part B. [S.l.]: Academic Press, 2020.

AKBARZADEH, M. et al. The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, dez. 2017.

ALVAREZ-ARTIME, A. et al. Melatonin-induced cytoskeleton reorganization leads to inhibition of melanoma cancer cell proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 2, p. 548, 15 jan. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer facts & figures 2019*. Atlanta: American Cancer Society, 2019a.

BAGHAL-SADRIFOROUGH, S. et al. Melatonin sensitizes OVCAR-3 cells to cisplatin through suppression of PI3K/Akt pathway. *Cellular and Molecular Biology*, v. 68, n. 4, p. 158–169, 2022.

BARDA-SAAD, M. et al. Adhesion of Thymocytes to Bone Marrow Stromal Cells: Regulation by bFGF and IFN- γ . *Stem Cells*, v. 15, n. 3, p. 229–236, 1 maio 1997.

BEAR, J. E. et al. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, v. 109, n. 4, p. 509–521, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00731-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00731-6).

CANCER TODAY. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&cancers=25&types=0_1&sort_by=value1&sexes=2&group_populations=1. Acesso em: 19 mar. 2025.

CECON, E.; OISHI, A.; JOCKERS, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *British Journal of Pharmacology*, v. 175, n. 16, p. 3263–3280, 17 ago. 2017.

CHUFFA, L. G. de A.; REITER, R. J.; LUPI, L. A. Melatonin as a promising agent to treat ovarian cancer: molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, v. 38, n. 10, p. 945–952, 2 jun. 2017.

CUCIELO, M. S. et al. Melatonin reverses the Warburg-type metabolism and reduces mitochondrial membrane potential of ovarian cancer cells independent of MT1 receptor activation. *Molecules*, v. 27, n. 14, p. 4350, 7 jul. 2022.

GHORBANI-ANARKOOLI, M. et al. Effects of melatonin on the toxicity and proliferation of human anaplastic thyroid cancer cell line. *Acta Histochemica*, v. 123, n. 3, p. 151700, 2 mar. 2021.

GUO, H. et al. The role of vitamin D in ovarian cancer: epidemiology, molecular mechanism and prevention. *Journal of Ovarian Research*, v. 11, p. 71, 2018.

HALL, A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 28, n. 1–2, p. 5–14, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9166-3>.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HSIAO, S.-Y. et al. Melatonin inhibits EMT in bladder cancer by targeting autophagy. *Molecules*, v. 27, n. 24, p. 8649, jul. 2022.

HSIEH, S. F. et al. Prognostic factors of early stage epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 4, p. 1–12, 2019.

HUANG, X. et al. Association between dietary fiber intake and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *Journal of International Medical Research*, v. 46, p. 3995–4005, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Tipos de câncer*. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 5 set. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). *Tipos de câncer*. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/ovario>. Acesso em: 23 jun. 2021.

JESSMON, P. et al. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 17, n. 5, p. 427–437, 2017.

JIA, S. et al. Down-regulation of WAVE2, WASP family verprolin-homologous protein 2, in gastric cancer indicates lymph node metastasis and cell migration. *Anticancer Research*, v. 34, n. 5, p. 2185–2194, 2014.

KIM, J.-H. et al. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *Journal of Pineal Research*, v. 52, n. 2, p. 244–252, mar. 2012.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drugs resistance. *Journal of Pathology*, v. 205, n. 2, p. 275–292, 2005.

NAZILA FATHI MAROUFI et al. Targeting cancer stem cells by melatonin: Effective therapy for cancer treatment. **Pathology - Research and Practice**, v. 216, n. 5, p. 152919–152919, 9 mar. 2020.

POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1208–1212, 26 nov. 2009.

POLLARD, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 8, p. a018226, 17 mar. 2016.

REITER, R. J.; MA, Q.; SHARMA, R. Melatonin in mitochondria: mitigating clear and present dangers. *Physiology*, v. 35, n. 2, p. 86–95, 2020. DOI: 10.1152/physiol.00034.2019.

SANTOS, C. L.; MENDES, R. S.; OLIVEIRA, L. M. Papel da melatonina na regulação do ciclo celular e apoptose em células tumorais. *Revista Brasileira de Oncologia Experimental*, v. 18, n. 3, p. 45–56, 2023.

SHARMA, R.; REITER, R. J.; MA, Q. Melatonin's role in oxidative stress and cancer cell metabolism. *Antioxidants*, v. 9, n. 11, p. 1088, 2020. DOI: 10.3390/antiox9111088.

SUN, C. et al. The role of actin and actin-binding proteins in cancer cell motility. *Oncogene*, v. 42, n. 12, p. 2034–2046, 2023.

TALIB, W. Melatonin and cancer hallmarks. *Molecules*, v. 23, n. 3, p. 518, 26 fev. 2018.

TSAI, C.-H. et al. Melatonin suppresses tumor progression by enhancing the p53-dependent apoptotic pathway. *Oncotarget*, v. 7, n. 33, p. 53241–53253, 2016.

VAN DEN ENT, F.; AMOS, L. A.; LÖWE, J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 39–44, set. 2001.

ZHANG, H. et al. Actin cytoskeleton dynamics and cancer progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 795, 2021.