

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir de
26/08/2021.

Giseli Mitsuy Kayahara

**Melatonin suppression increases the incidence and
progression of chemically induced oral cancer in rats**

Araçatuba-SP

2019

Giseli Mitsuy Kayahara

**Melatonin suppression increases the incidence and
progression of chemically induced oral cancer in rats**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba – Unesp, para obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” - Área de concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé.

Coorientadores: Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini e Profa. Dra. Kellen Cristine Tjioe

Araçatuba-SP

2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

K23m Kayahara, Giseli Mitsuy.
Melatonin suppression increases the incidence and progression of chemically induced oral cancer in rats / Giseli Mitsuy Kayahara. – Araçatuba, 2019
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Daniel Galera Bernabé
Coorientador: Prof. Marcelo Macedo Crivelini
Coorientadora: Profa. Kellen Cristine Tjioe

1. Melatonin 2. Mouth neoplasms 3. Head and neck neoplasms 4. Carcinoma, Squamous Cell I. Título

Black D6
CDD 617.63

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A Deus, pela oportunidade e suporte;

À minha família, por sempre ser o meu amparo;

A todos os pacientes oncológicos. Espero um dia produzir conhecimento suficiente para ajudá-los de alguma forma.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Nenhum trabalho científico ou de qualquer outra natureza poderá, jamais, ser concretizado sem a colaboração e dedicação de uma equipe inteira e sem o devido sentimento de gratidão por tudo que é realizado em favor do sucesso de alguém. Sendo assim, este trabalho foi realizado com a ajuda de inúmeras pessoas que sempre estiveram dispostas a dar seu apoio e auxílio da melhor maneira possível. Por isso, agradeço imensa e carinhosamente:

A **Deus**, pelo cuidado e amparo despendidos a mim e à minha família em todos os momentos. Por me conferir força, saúde e perseverança a fim de alcançar a vitória em todas as batalhas que escolho enfrentar na vida. Muito obrigada por me acompanhar e me guiar em todos os momentos.

Aos **meus pais, irmãos e toda minha família** pela educação e formação que me proporcionaram. Pelo apoio em todos os momentos e pelo brilho nos olhos em cada conquista que alcancei. É por vocês que cheguei até aqui. É por vocês que muitas outras coisas ainda serão conquistadas. Vocês são meu porto seguro. Obrigada pela persistência na minha educação, pela existência no meu caminho e por me ensinarem que a maior conquista da vida é voltar para casa no fim de uma jornada e ter quem você ama te esperando com um sorriso no rosto, um beijo e um abraço apertado, independente do que tenha ocorrido no decorrer do dia.

Ao meu namorado **Vitor Bonetti Valente** pelo apoio, pela paciência, por todo o conhecimento compartilhado comigo, pela confiança, compreensão e amor. Obrigada por todos os experimentos, pelos conselhos, por toda sua dedicação para a minha formação e crescimento profissional e pessoal. Obrigada por cada momento, por vivenciar cada etapa desta longa jornada de forma tão intensa e próxima e, principalmente, por me ancorar em todos os momentos e não me deixar desistir dos meus sonhos e objetivos. Você é uma pessoa adorável e de caráter inestimável. Sem você este dia não seria possível. Eu amo você!

À família **Bonetti Valente** que me acolheu como filha. Muito obrigada por sempre se importarem comigo e com meu bem-estar. Vocês são grandes exemplos de lealdade, honestidade, fé e solidariedade. Eu admiro muito a forma como vocês levam a vida e proporcionam aos menos favorecidos a

oportunidade de viver um pouco melhor. Vocês são um pedacinho da minha família. Vocês são um pedacinho de mim.

Ao meu grande e insubstituível amigo, **José Marcelo Tramarin** (Marcelinho), por compartilhar todos os frutos de mais de 30 anos de profissão e por me formar uma profissional melhor, mais dedicada e apaixonada pelo que faço. Ninguém no mundo ensinaria tudo isso com tamanho amor e diploma algum proporcionaria tudo que você me proporcionou. Agradeço por cada instante de carinho infinito, por cada abraço apertado e por cada momento de diversão. Agradeço imensamente a Deus por tê-lo colocado em meu caminho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé**, por contribuir de maneira singular para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Agradeço pela oportunidade, pela confiança em mim e no meu trabalho, pela orientação, amizade, conselhos e por partilhar, pacientemente, o seu conhecimento e experiência comigo. Você é exemplo de ética, honestidade e paixão pela carreira que escolheu trilhar. Obrigada por tornar menos difícil a batalha do dia-a-dia de pesquisa e pós-graduação. Obrigada por toda a ajuda e energia despendidas a mim e ao meu trabalho. Tê-lo como mestre foi uma honra.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Kellen Cristine Tjioe**, pela contribuição dada à minha formação. Obrigada pela ajuda, pelos dias divertidos e por todo o conhecimento compartilhado. Obrigada pelas orientações para os seminários, pela ajuda com as descrições de fotos clínicas e exames imaginológicos. Mesmo não fazendo parte da minha rotina, aprender tantas coisas com seu jeito leve e divertido, foi uma espetacular experiência.

Ao meu co-orientador, **Prof. Marcelo Macedo Crivelini**, por quem tenho imensa admiração e apreço. Obrigada pela essencial contribuição para que este trabalho se concretizasse. Obrigada pelas análises microscópicas, pela paciência e dedicação ao me ensinar. O senhor é um grande exemplo para mim.

À professora **Ana Maria Pires Soubhia** que contribuiu diretamente para a minha iniciação profissional nesta faculdade. Obrigada por ter sido a grande responsável pelo início de tudo. Ter me alocado na Patologia foi, com certeza, uma das melhores decisões tomadas pela senhora para a caminhada de uma

pessoa que até então era completamente desconhecida. A senhora é exemplo de pessoa, carisma, amor e dedicação para todos à sua volta.

À professora **Cristiane Furuse**, que com seu jeito sempre carismático e divertido, ensina e cativa a todos como ninguém. Você leva alegria, luz e leveza por todos os lugares. Você é peça fundamental para o meu aprendizado e evolução pessoal e espiritual. Muito obrigada por tudo, Cris.

À professora **Renata Callestini**, sempre carinhosa e com o coração cheio de amor e fé. Obrigada por fazer parte da minha história e por me mostrar em momentos oportunos, que os nossos sonhos são maiores que toda e qualquer decepção e dificuldade. Seus conselhos foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.

Às disciplinas de Patologia Geral e Bucal da FOA-Unesp, nas figuras de seus professores **Ana Maria Pires Soubhia, Cristiane Furuse, Marcelo Macedo Crivelini e Renata Callestini**, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio nos momentos de necessidade, pelos conselhos e pela amizade. Tenho um imenso carinho e eternas admiração e gratidão por cada um de vocês. Obrigada por me permitirem a realização de um sonho.

Aos professores da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOA/Unesp, **Ana Cláudia Okamoto e Élerson Gaetti Jardim Filho** pela convivência e apoio durante este período de pós-graduação e de trabalho na Unesp.

Ao técnico da disciplina de Microbiologia, **Robson Varlei Ranieri**, pela alegria com que me recebe todos os dias, desde o primeiro dia em que cheguei ao departamento. Obrigada por estar sempre disposto a ajudar quantas vezes for preciso.

À professora da disciplina de Radiologia, **Leda Maria Salzedas Pescinini**, que sempre me concedeu seu apoio para que esse momento fosse conquistado. Tenho grande admiração por tudo que você realiza pela disciplina de Radiologia, pelo Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica e pela Faculdade de Odontologia. Parabéns por tanta força e Obrigada por tudo!

Ao professor da disciplina de Estomatologia, **Éder Ricardo Biasoli**, pela alegria e irreverência que sempre leva consigo. Obrigada por tornar os dias mais leves, divertidos e prazerosos.

Ao professor da disciplina de Estomatologia e ex-supervisor do Centro de Oncologia Bucal e director desta faculdade, **Prof. Glauco Issamu Miyahara**, por contribuir para o meu aprendizado e crescimento pessoal, profissional e intelectual. O senhor é um grande exemplo de honestidade, retidão, dedicação e competência como pessoa, professor e gestor. Obrigada por viabilizar a realização de tantas coisas que sem a sua ajuda, não seriam concretizadas.

À professora **Sandra Helena Penha de Oliveira**. Obrigada por ceder seu laboratório para que nossas pesquisas possam ser realizadas. Sem sua contribuição e sua generosidade nenhum dos nossos trabalhos seriam possíveis. Obrigada por seu pulso firme, sua cobrança e seu jeito sempre divertido! Muito obrigada por contribuir substancialmente para a realização dos nossos sonhos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Odontologia – Área de concentração em Estomatologia (**Prof. Daniel Galera Bernabé**, **Prof. Glauco Issamu Miyahara** e **Profa. Kellen Cristine Tjioe**), por me permitirem o contato direto com os pacientes do Centro de Oncologia Bucal durante o ambulatório da pós-graduação. Obrigada por terem confiado a mim esta possibilidade e honra, mesmo eu não sendo dentista. Levarei para sempre em meu coração os momentos vividos no ambulatório e as inúmeras histórias de tantos pacientes que dividiram seus pesares e evoluções conosco. Levarei para sempre comigo a gratidão pela oportunidade que me deram.

À secretária do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, **Adriana de Paula e Silva Rahal Leal** pela dedicação e prestatividade de todos os dias para que tudo seja realizado da maneira mais completa e perfeita possível. Obrigada pelo carinho, amizade, “maternidade” e ajuda incondicional que sempre me dedicou.

À secretária do Centro de Oncologia Bucal, **Jane Fátima Mendes Fernandes da Silva**, que sempre nos recebe com um sorriso no rosto, um “bom dia” bem-humorado, cheia de doçura e carinho. Muito obrigada por tornar nossos dias melhores, Janinha.

A todos os funcionários do Centro de Oncologia Bucal por contribuírem direta ou indiretamente com nossas pesquisas e por prestarem um atendimento

especializado que é tão importante para a sociedade. Obrigada e parabenizada pelo trabalho impecável e indispensável realizado por cada um de vocês.

Aos funcionários do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-Unesp), **Sr. Camilo** e **Sr. João Batista**. Muito obrigada pela paciência e disposição em ajudar todas as vezes que foram necessárias. Obrigada por sempre nos atenderem com tanta prestatividade. Com toda certeza, esta dissertação não existiria sem a ajuda de vocês.

Ao professor **Daniel Araki Ribeiro**, docente da Unifesp, *campus* de Santos, pela prestatividade e empréstimo do carcinógeno 4NQO quando necessitamos

Aos professores **Edilson Ervolino** e **Luciano Cintra** e aos seus alunos **Luan Felipe Toro** e **Pedro Henrique Chaves** pela contribuição para a realização das fotos histológicas deste trabalho.

À professora **Tereza Cristina Cardoso** por ceder seu laboratório para que pudessem ser realizadas as análises de biologia molecular.

Às funcionárias da seção de pós-graduação da FOA/Unesp, **Valéria**, **Lilia** e **Cristiane**, por serem prestativas e solícitas sempre. Obrigada por contribuírem de forma única e tão preciosa para que os mestres e doutores de nossa faculdade alcancem seus títulos.

A todos os funcionários da Seção de Manutenção desta faculdade. Obrigada pelo conserto dos nossos equipamentos, pelos reparos em nosso laboratório e por serem tão solícitos em todas as ocasiões.

Aos alunos **Lia Kobayashi**, **Felipe Yudi**, **Ana Carolina Lima**, **Letícia Cordeiro Menezes**, **Rosani Belzunces**, **José Maia Neto**, **Mayra Fernanda** pela imensa contribuição de vocês para o acontecimento deste trabalho. A dedicação e comprometimento de vocês aos projetos de pesquisa desenvolvidos pelo nosso grupo revela o quanto bem sucedidos vocês serão logo em breve, com certeza. Muito obrigada pelos momentos vividos juntos e obrigada por tudo que vocês fizeram por mim e pelo meu trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação, **Saygo Tomo**, **Jéssica Araújo Figueira**, **Stephanye Biss**, **Bruna Sarafim**, **Flávia Alves Verza**, **Tamara Fernandes Castro**, **Daniela Bastos**, **Maria Clara Botelho**, **Ana Daniela Spínola**, **Daniela Cantieri** e **Gabriela**. Vocês tornaram esta jornada muito mais fácil e prazerosa. É sempre muito bom ter pessoas tão

especiais ao nosso lado e que podem nos ceder uma palavra amiga, um abraço ou um olhar de compaixão nos momentos de necessidade. Obrigada pela existência de vocês durante este percurso, meus amigos.

À **Aline Satie Takamiya** pela ajuda em todos os momentos que precisei. Obrigada, Alininha, por todos os finais de semana no laboratório, por todos os conselhos, por preencher de tranquilidade o meu coração desesperado e pela ternura que sempre teve comigo e com todos à sua volta. Você é uma | iluminada e abençoada.

Aos meus amigos, **Noelle Kiill, Wagner Garcez de Mello, Samuel Moraes, Nathália Dias, Olívia Borghi e Nara Guimarães**. Vocês sempre estiveram presentes nesta jornada, mesmo antes dela começar. Muito obrigada por me apresentarem à ciência, por me apoiarem em todas as minhas decisões, por estarem sempre presentes na minha vida! Vocês foram e são essenciais para o meu sucesso científico.

Ao meu amigo **Maurício Fabiano Pereira (*in memoriam*)**. Você deixou sua luz e carisma por todos os lugares onde passou. Todos que te conheceram, aprenderam a ser um pouco melhores com seu jeito irreverente de ser. Você foi intenso, imenso, cheio de brilho, de amor e de cuidado comigo. Muito obrigada por ter feito parte do meu caminho, mesmo que por tão pouco tempo. Que você esteja na companhia de Deus e que um dia a gente se reencontre.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/Unesp) pela possibilidade de trabalhar, conhecer pessoas extraordinárias e pela oportunidade de estudar e conquistar muito mais que um salário no fim do mês.

Aos meus amigos **Douglas Henrique Silva, Paulo Ricardo, Paola Tiemi e Cristielen Corte**. Vocês estão comigo desde a infância e/ou adolescência. Vocês acompanharam meu trajeto, meu amadurecimento, meu crescimento pessoal e profissional sempre. Essa conquista também é de vocês e para vocês. Apesar da distância atual, cada um à sua maneira, contribuiu para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada pela amizade e pelo companheirismo de vocês.

A todas as pessoas que fizeram parte da minha caminhada até aqui, direta ou indiretamente, e que contribuíram de alguma forma para este momento, eu agradeço de coração.

Epígrafe

EPIGRAFE

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

Carl Jung

Resumo

Kayahara GM. **SUPRESSÃO DE MELATONINA AUMENTA A INCIDÊNCIA E PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BOCA INDUZIDO QUIMICAMENTE EM RATOS** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019

RESUMO

Estudos sugerem que a supressão de melatonina e disfunção circadiana em trabalhadores noturnos podem estar relacionadas ao desenvolvimento e à progressão do câncer. Pesquisas têm mostrado também que a incidência tumoral pode ser aumentada pela pinealectomia. Entretanto, nenhum estudo avaliou a influência da cirurgia de pinealectomia sobre o desenvolvimento e a progressão do câncer de boca. No presente estudo, nós investigamos os efeitos da supressão de melatonina sobre a ocorrência e a progressão tumoral um modelo pré-clínico de câncer de boca induzido quimicamente. Nós demonstramos, pela primeira vez, que ratos pinealectomizados tiveram maior ocorrência de carcinoma espinocelular de boca, comparado aos animais controle. Ratos pinealectomizados também exibiram volume e espessura tumorais cerca de 3 e 2 vezes maior que animais sham, respectivamente. Além disso, pinealectomia induziu atrofia do epitélio não-tumoral adjacente às lesões bucais. Os ratos pinealectomizados apresentaram maior resposta inflamatória no front de invasão tumoral, caracterizada principalmente pelo aumento do número de eosinófilos e macrófagos associados ao tumor. Tumores de ratos submetidos à pinealectomia exibiram maior imunoexpressão de ERK1/2 e p53 no microambiente tumoral. Estes resultados revelam que a supressão de melatonina acelera o desenvolvimento e a progressão do câncer de boca associado ao

aumento de eosinófilos e macrófagos no front de invasão tumoral e maior expressão de ERK1/2 e p53 no microambiente tumoral.

Palavras-chave: Melatonina; Câncer de boca; Câncer de cabeça e pescoço; Carcinoma espinocelular

Abstract

Kayahara GM. **MELATONIN SUPPRESSION INCREASES THE INCIDENCE AND PROGRESSION OF CHEMICALLY INDUCED ORAL CANCER IN RATS** [dissertation]. São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil; 2019.

ABSTRACT

Studies suggest that melatonin suppression and circadian dysfunction in shift workers can be related to cancer risk. Furthermore, investigations have shown that pinealectomy promotes higher tumor incidence in rats. However, no study evaluated the influence of pinealectomy surgery on oral cancer onset and progression. In the current study, we investigated the effects of melatonin suppression on tumor occurrence and progression in a preclinical model of oral cancer. We demonstrated for the first time that pinealectomized rats had higher oral squamous cell carcinoma occurrence than sham animals. Furthermore, pinealectomized animals displayed tumor volume and thickness about 3 times and twice higher than sham-operated rats, respectively. Moreover, pinealectomy induced atrophy of non-tumor epithelium adjacent to the oral lesions. Pinealectomized rats showed higher mean number of tumor-associated macrophages and eosinophils in the carcinoma invasion front. In addition, tumors from pinealectomized rats displayed increased immunoexpression of ERK1/2 and p53 in the tumor microenvironment. These results reveal that melatonin suppression promotes higher oral cancer occurrence and progression

associated with increasing of inflammatory cells and ERK1/2 and p53 expressions in the tumor microenvironment.

Keywords: Melatonin; Mouth neoplasms; Head and neck neoplasms; Carcinoma, Squamous Cell

Lista de figuras

Lista de figuras

Figure 1. Clinical features of OSCCs derived from 4NQO treatment in sham (A and B) and PNT rats (C and D). **A)** Small irregular white plates. **B)** Discrete ulcerative lesion. **C)** Ulcerative lesion displaying white and reddish surface. **D)** Extensive ulcer with yellowish-white areas. **Histopathological features of tongue tumors from sham (E and F) and PNT rats (G and H) (H&E staining).** **E)** Well-differentiated OSCC (black arrows) (original magnification x250). **F)** Tumor cells showing hyperchromatism and dyskeratosis (original magnification x400). **G)** Extensive Well-differentiate OSCC (original magnification x250). **H)** Islands of well-differentiated tumor cells with nuclear pleomorphism and keratin pearls (original magnification x400). **Occurrence and progression of OSCC from sham and PNT animals.** **I)** Chi-square test revealed that PNT rats had a higher occurrence of OSCC than sham rats. **J)** Student's t-test showed that PNT group exhibited increased tumor volume compared to sham group. **K)** PNT rats exhibited higher tumor thickness than sham animals. (sham, n=11; PNT, n=12;) Bars represent the mean \pm SEM. *p<0.05

Figure 2. Anxiety- and depressive-like behavior from sham and PNT rats. **A)** There were no differences in the depressive-like behavior from sham and PNT rats before and after carcinogenesis. **B)** Student's t-test revealed no differences in the

anxiety-like behavior from sham and PNT groups before and after carcinogenesis. Bars represent the mean \pm SEM. $p > 0.05$. (sham, $n = 11$; PNT, $n = 12$).

Figure 3. Epithelial thickness of non-tumor epithelium adjacent to the tongue lesions derived from 4NQO treatment. A-C) Student's test showed no statistical differences regarding to epithelial thickness, corneal thickness and total thickness of non-tumor epithelium immediately adjacent to the tongue lesions derived from 4NQO treatment in PNT and sham animals. **Epithelial thickness of non-tumor epithelium in the distant sites from the lesion. D)** There were no differences in non-tumor oral epithelial thickness between both groups. **E)** PNT rats displayed lower corneal thickness of non-tumor epithelium than sham group. **F)** Student's t-test revealed that PNT group had decreased total thickness of non-tumor epithelium compared to sham rats. **G and H)** Total epithelial thickness of non-tumor epithelium immediately adjacent to the lesion from sham and PNT group, respectively (H&E, original magnification $\times 100$). **I and J)** Total epithelial thickness of non-tumor epithelium distant to the lesion from sham and PNT rats, respectively (H&E, original magnification $\times 100$). Bars represent the mean \pm SEM. $*p < 0.05$ (sham-PNT, $n = 10$; PNT, $n = 10$).

Figure 4. Inflammatory response in the tumor invasion front. Student's t-test showed no differences in the average number of leukocytes (**A**), neutrophils (**C**), mast cells (**E**) and lymphocytes (**G**) in the OSCCs from sham and PNT animals. PNT rats displayed increased average number of tumor-associated eosinophils (**I**) and macrophages (**K**) compared to sham animals. Tumor size was not associated with the average number of neutrophils (**D**) and mast cells (**F**) in the invasion front in sham and PNT rats. Advanced tumor-bearing PNT rats had higher average number of leukocytes (**B**), lymphocytes (**H**) and eosinophils (**J**). Early or advanced tumor-bearing PNT rats exhibited increased average number of macrophages than Sham

rats (**L**). * $p < 0.05$. Bars represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$. **ES**: Early stage. **AS**: Advanced stage. (sham, n=5; PNT, n=11).

Figure 5. Expression of tumor progression-related genes and melatonin receptors and immunostaining of PKA, ERK1/2 and p53 in the OSCC microenvironment. A – F) Student's t-test showed no differences between sham and PNT OSCCs for mRNA expression of VEGF, NF κ B, CDKN2A-p16, MMP2, MMP9 and MTNR1a. **G)** Student's t-test showed no statistical differences between both groups for PKA expression in OSCCs. **H)** PNT rats had increased tumor expression of ERK1/2 compared to sham animals. **I)** PNT animals displayed higher tumor expression of nuclear p53 than sham rats. Immunoexpression of PKA (**J and K**), ERK1/2 (**L and M**) and p53 (**N and O**) in OSCC invasion front from sham and PNT rats, respectively (original magnification x400). Bars represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$. (sham-PNT, n= 7; PNT, n= 9).

Lista de Abreviaturas

Lista de abreviaturas

4-NQO – 4-nitroquinoline-1-oxide

Akt - Serine/threonine-specific protein kinase

ANOVA – Analysis of variance

Bcl-2 – B-cell lymphoma protein 2

CDKN2a-p16 – cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

cDNA – Complementary DNA

DMBA – 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene

DNA – Deoxyribonucleic acid

ERK1/2 – Extracellular signal-regulated kinases 1 e 2

EZM – Elevated zero maze

FST – Forced swimming test

H&E – Hematoxylin and eosin

H₂O₂ – Hydrogen peroxide

HIF-1 α – Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HNC – Head and neck cancer

IL-17 – Interleukin 17

IL6 – Interleukin 6

LSD1 – Histone lysine-specific demethylase

MAPK – Mitogen-activated protein kinase

mM – millimolar

mm³ – cubic millimeter

MMP-2 – Metalloproteinase 2

MMP-9 – Metalloproteinase 9

mRNA – Messenger ribonucleic acid

MT1 – Melatonin receptor 1

MT2 – Melatonin receptor 2

MTRN1a – Melatonin Receptor 1A

MTRN1b – Melatonin Receptor 1B

NF- κ B – Factor nuclear kappa B

OSCC – Oral squamous cell carcinoma

PBS – Phosphate buffer solution

PCNA – Proliferating cell nuclear antigen

PCR – Polymerase chain reaction

PCR – Polymerase chain reaction

PKA – Protein kinase A

PNT – Pinealectomy

RNA – Ribonucleic acid

ROCK-1 – Rho-associated protein kinase 1

ROS – Reactive oxygen species

RQ – Relative Quantity

RT-PCR – Real time polymerase chain reaction

SCN – Suprachiasmatic nucleus

SEM – Standard error media

SNS – Sympathetic nervous system

TNF- α – Tumor necrosis factor alpha

USA – United States of America

VEGF – Vascular endothelial growth factor

Vs – Versus

WHO – World Health Organization

μm – micrometer

Sumário

Sumário

1. Introduction.....	32
2. Material and methods.....	36
2.1 Animals and experimental design.....	36
2.2 Behavioral phenotyping.....	37
2.2.1 Forced swimming test (FST).....	37
2.2.2 Elevated zero maze (EZM).....	38
2.3 Pinealectomy.....	37
2.4 Oral carcinogenesis model.....	38
2.5 Histopathological analysis.....	38
2.6 Evaluation of tumor thickness and volume.....	39
2.7 Epithelial thickness measurement of non-tumor oral epithelium.....	39
2.8 Inflammatory cells quantification in the tumor invasion front.....	40
2.9 Immunohistochemistry.....	40
2.10 Expression of tumor progression-related genes and melatonin receptors.....	41
2.11 Statistical analysis.....	42
3. Results.....	45
3.1 Melatonin suppression induces oral cancer occurrence and progression.....	45
3.2 Effects of pinealectomy on the depressive- and anxiety-like behaviors.....	47
3.3 Melatonin suppression promotes atrophy of non-tumor oral epithelium.....	49

3.4 Melatonin suppression promotes increase of inflammatory cells in the tumor invasion front.....	51
3.5 Tumors from PNT rats display higher p53 and ERK1/2 expression in the OSCC invasion front.....	53
4. Discussion.....	56
5. Conclusion.....	64
Referências	66
Anexo A.....	77
Anexo B.....	79

Title: Melatonin suppression increases the incidence and progression of chemically induced oral cancer

Short title: Melatonin suppression accelerates cancer onset

Giseli Mitsuy Kayahara^{a,b}, Vitor Bonetti Valente^a, Rosani Belzunces Pereira^a, Felipe Yudi Kabeya Lopes^a, Marcelo Macedo Crivelini^b, Glauco Issamu Miyahara^{a,b}, Éder Ricardo Biasoli^{a,b}, Sandra Helena Penha Oliveira^c, Daniel Galera Bernabé^{a,b}

^aPsychoneuroimmunology Laboratory, Psychosomatic Research Center, Oral Oncology Center, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Pathology, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^cLaboratory of Immunopharmacology, Department of Basic Sciences, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

Word count: 4923

***Corresponding author:**

Dr. Daniel Galera Bernabé

Assistant Professor; Psychoneuroimmunology Laboratory, Psychosomatic Research Center, Oral Oncology Center, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

Telephone numbers: +55 18 36363268 / 36363275

E-mail address: daniel.bernabe@unesp.br

Keywords: Melatonin; Mouth neoplasms; Head and neck neoplasms; Carcinoma, Squamous Cell

Formatted according to the rules of **Endocrine-Related Cancer**

Introduction

1. Introduction

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a hormone released by the pineal gland in response to darkness (Li et al., 2017). Melatonin secretion is controlled by the suprachiasmatic nucleus (SCN), which relays photoperiodic information to the pineal via sympathetic nervous system (SNS) (Tan et al., 2015). However, melatonin is also synthesized in many sites such as gastrointestinal tract, skin, retina, and bone marrow (Acuña-Castroviejo et al., 2014). In addition to the circadian rhythm control, pineal hormone has antioxidant, anti-inflammatory and oncostatic activities (Karaaslan et al. 2015). Recently, studies have shown that melatonin may inhibit breast cancer progression (Mao et al., 2012; Jardim-Perassi et al., 2014). Melatonin may affect tumor growth by reducing cell proliferation and angiogenesis and inhibiting DNA damage, besides increasing the activity of tumor suppressor genes and apoptosis of tumor cells (Panzer and Viljoen, 1997). A study showed that lung metastasis of gastric cancer may be inhibited by melatonin through downregulation of MMP-2, MMP-9, and NF- κ B expressions (Wang et al., 2019). Few investigations analyzed the effects of melatonin suppression on cancer

onset in pre-clinical models. Pinealectomized rats had higher incidence of DMBA-induced mammary cancer than sham-operated animals (Tamarkin et al., 1981; Shah et al., 1984). However, no studies have investigated the impact of pinealectomy on other types of cancer.

Melatonin may regulate cell proliferation and apoptosis in cancer through the p53 signaling pathway (Santoro et al. 2013). In breast and colon cancers cell lines, melatonin inhibited cell proliferation and prevented DNA damage of tumor cells through the p53 activation (Santoro et al., 2013). Furthermore, melatonin administration inhibited lymphoma development in Trp53^{-/-} mice, compared to non-treated group (Huang et al., 2015). Melatonin also may influence tumor progression through the ERK1/2 modulation (Cagnol & Chambard 2010). On cancer, ERK1/2 may mediate several events including apoptosis, cell proliferation and metastasis (Olea-Flores et al., 2019). A recent study showed in an orthotopic model of oral cancer, that melatonin administration reduced the p-ERK levels in the tumor microenvironment (Liu et al., 2018). Moreover, melatonin increases the sensibility of esophageal cancer to fluorouracil chemotherapy through ERK signaling pathway inhibition (Lu et al., 2016).

Inflammation play a critical role in cancer onset and progression (Coussens & Werb, 2002). Liu et al. (2019) demonstrated that oncology patients with high systemic inflammation index had lower disease-free survival and decreased distant metastasis-free survival compared to patients with low inflammation levels. Systemic inflammation has also been associated with an increase in depth tumor invasion, greater risk of regional metastasis, and advanced clinical stage in patients with esophageal cancer (Zhang et al., 2019).

Melatonin is considered an important molecule with anti-inflammatory features (Najafi et al., 2017). The hormone suppresses the increase of TNF- α and IL6 proinflammatory cytokines in ovary cancer rats (Chuffa et al., 2015). Furthermore, melatonin administration promoted lower Infiltration of eosinophils, IL-17+ inflammatory cells and Foxp3+ cells in the tumor tissue of hamsters with chemically induced cholangiocarcinoma (Wongsena et al., 2018).

Currently, head and neck cancer (HNC) is the 3th most incident and the 7th leading cause of cancer death worldwide, with oral squamous cell carcinoma (OSCC) being its main subtype (Bray et al., 2018). Melatonin treatment may inhibit tumor progression and metastasis, as well as improve responses of head and neck oncology patients to chemotherapy treatment (Yeh et al., 2016; Lu et al., 2016; Shen et al., 2018). *In vitro* studies show that pineal hormone affects the motility of OSCC cell lines by inhibiting MMP-9 and VEGF transcription, which are molecules known to influence tumor progression (Goncalves et al., 2014; Yeh et al., 2016). Furthermore, melatonin significantly suppresses cell proliferation in dose- and time-dependent manner in an orthotopic model of oral cancer and *in vitro* by reducing histone lysine-specific demethylase (LSD1) expression (Yang et al., 2017). Other investigations have demonstrated that melatonin may be a good adjuvant therapy for cancer treatment (Li et al., 2017; Lissoni et al. 1999). Lissoni et al (1999) revealed that HNC patients concomitantly treated with melatonin and chemotherapy displayed higher 1-year survival rate and increased tumor remission rate than those who received chemotherapy alone. Despite evidences of the melatonin effects on the cancer progression, its role on the tumorigenesis is poorly known. In this research, we used a preclinical oral carcinogenesis model to test the hypothesis that the

melatonin suppression would promote higher chemically induced cancer occurrence and progression in rats.

References

Referências

1. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan D, Reiter R 2014 Extraneal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 71:2997–3025
2. Alvisi S, Baldassarre M, Gava G, Mancini I, Gagliardi M, Seracchioli R, Meriggiola MC 2018 Structure of Epithelial and Stromal Compartments of Vulvar and Vaginal Tissue From Women With Vulvo-Vaginal Atrophy Taking Ospemifene. *J Sex Med.* 15(12):1776-1784
3. Amin AH, El-Missiry MA, Othman AI, Ali DA, Gouda MS, Ismail AH 2019 Ameliorative effects of melatonin against solid Ehrlich carcinoma progression in female mice. *J Pineal Res.* 8:e12585.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A 2018 Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 6:394-424
5. Bustamante-García R, Lira-Rocha AS, Espejo-González O, Gómez-Martínez AE, Picazo O 2014 Anxiolytic-like effects of a new 1-N substituted analog of melatonin in pinealectomized rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 51:133-9.
6. Cagnol S, Chambard JC 2010 ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 1:2-21

7. Chuffa LG, Fioruci-Fontanelli BA, Mendes LO, Ferreira Seiva FR, Martinez M, Fávoro WJ, Domeniconi RF, Pinheiro PF, Delazari Dos Santos L, Martinez FE 2015 Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 15:34
8. Colombo J, Jardim-Perassi BV, Ferreira JPS, Braga CZ, Sonehara NM, Júnior RP, Moschetta MG, Girol AP, Zuccari DAPC 2018 Melatonin Differentially Modulates NF- κ B Expression in Breast and Liver Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 12:1688-1694.
9. Coussens LM, Werb Z 2002 Inflammation and cancer. *Nature*. 6917:860-7
10. Dair EL, Simoes RS, Simões MJ, Romeu LR, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, Baracat EC, Soares JM Jr 2008 Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril*. 5 Suppl:1299-305
11. Dauchy RT, Blask DE, Dauchy EM, Davidson LK, Tirrell PC, Greene MW, Tirrell RP, Hill CR, Sauer LA 2009 Antineoplastic effects of melatonin on a rare malignancy of mesenchymal origin: melatonin receptor-mediated inhibition of signal transduction, linoleic acid metabolism and growth in tissue-isolated human leiomyosarcoma xenografts. *J Pineal Res*. Aug;47(1):32-42
12. De Paz D, Chang KP, Kao HK, Lao WW, Huang YC, Chang YL, Huang Y 2019 Clinical Implications of Tumor-Associated Tissue Eosinophilia in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope*. 5:1123-1129
13. Devore EE, Warner ET, Eliassen AH, Brown SB, Beck AH, Hankinson SE, Schernhammer ES 2017 Urinary Melatonin in Relation to Postmenopausal

- Breast Cancer Risk According to Melatonin 1 Receptor Status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3:413-419
14. El-Domeiri AA, Das Gupta TK 1976 The influence of pineal ablation and administration of melatonin on growth and spread of hamster melanoma. *J Surg Oncol.* 3:197-205
 15. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ 2017 WHO classification of head and neck tumours (9th ed.), IARC, Lyon
 16. Eşrefoglu M, Seyhan M, Gül M, Parlakpınar H, Batçioğlu K, Uyumlu B 2005 Potent therapeutic effect of melatonin on aging skin in pinealectomized rats. *J Pineal Res.* 3:231-7
 17. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX 2013 Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 10:1014-22
 18. Goncalves NN, Rodrigues RV, Jardim-Perassi BV, Moschetta MG, Lopes JR, Colombo J, Zuccari DA 2014 Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin. *Anticancer Agents Med Chem.* 9:1302-11
 19. Hoffman RA, Reiter RJ 1965 Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec.* 1:19-21
 20. Huang HS, Chu SC, Hsu CF, Chen PC, Ding DC, Chang MY, Chu TY 2015 Mutagenic, surviving and tumorigenic effects of follicular fluid in the context of p53 loss: initiation of fimbria carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 11:1419-28
 21. Hunter CM, Figueiro MG. Measuring Light at Night and Melatonin Levels in Shift Workers: A Review of the Literature. *Biol Res Nurs.* 2017; 4:365-374.
 22. Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander AS, Shankar A, Ali MM, de Campos Zuccari DA 2014 Effect of melatonin on

- tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. 9:e85311
23. Jockers R, Delagrangé P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, Cecon E, Zlotos DP 2016 Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br J Pharmacol*. 173(18):2702-25
24. Karaaslan C, Suzen S 2015 Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. *Curr Top Med Chem*. 9:894-903
25. Kouketsu A, Sato I, Oikawa M, Shimizu Y, Saito H, Tashiro K, Yamashita Y, Takahashi T, Kumamoto H 2019 Regulatory T cells and M2-polarized tumour-associated macrophages are associated with the oncogenesis and progression of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 19: 31084-7
26. Lewy AJ, Tetsuo M, Markey SP, Goodwin FK, Kopin IJ 1980 Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab*. 1:204-5.
27. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB 2017 Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*. 2017; 24:39896-39921
28. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, Longarini R, Malugani F, Tancini G 1999 Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer*. 12:1688-92
29. Liu J, Shi Z, Bai Y, Liu L, Cheng K 2019 Prognostic significance of systemic immune-inflammation index in triple-negative breast cancer. *Cancer Manag Res*. 11:4471-4480.
30. Liu R, Wang HL, Deng MJ, Wen XJ, Mo YY, Chen FM, Zou CL, Duan WF, Li L, Nie X 2018 Melatonin Inhibits Reactive Oxygen Species-Driven

- Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Vasculogenic Mimicry in Oral Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2018:3510970.
31. Lu YX, Chen DL, Wang DS, Chen LZ, Mo HY, Sheng H, Bai L, Wu QN, Yu HE, Xie D, et al. 2016 Melatonin enhances sensitivity to fluorouracil in oesophageal squamous cell carcinoma through inhibition of Erk and Akt pathway. *Cell Death Dis*. 10:e2432.
 32. Mao L, Dauchy RT, Blask DE, Slakey LM, Xiang S, Yuan L, Dauchy EM, Shan B, Brainard GC, Hanifin JP, et al. 2012 Circadian gating of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells via melatonin-regulation of GSK3beta. *Mol Endocrinol*. 26:1808–1820
 33. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B 1996 Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med*. 3:307-15
 34. Martindale JL, Holbrook NJ 2002 Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol*.192: 1–15.
 35. Najafi M, Shirazi A, Motevaseli E, Rezaeyan AH, Salajegheh A, Rezapoor S 2017 Melatonin as an anti-inflammatory agent in radiotherapy. *Inflammopharmacology*. 25:403–13.
 36. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, et al. 2008 Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*. 99(7):1390-400
 37. Olea-Flores M, Zuñiga-Eulogio MD, Mendoza-Catalán MA, Rodríguez-Ruiz HA, Castañeda-Saucedo E, Ortuño-Pineda C, Padilla-Benavides T, Navarro-Tito N 2019 Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Int J Mol Sci*. 20(12)

38. Oner H, Kus I, Oner J, Ogetürk M, Ozan E, Ayar A 2004 Possible effects of melatonin on thymus gland after pinealectomy in rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 1-2:115-8.
39. Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, Dayoub JC, López LC, Venegas C, García JA, López A, Volt H, Luna-Sánchez M, et al. 2015 Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J Pineal Res.* Jan;58(1):34-49
40. Panagopoulos V, Leach DA, Zinonos I, Ponomarev V, Licari G, Liapis V, Ingman WV, Anderson P, DeNichilo MO, Evdokiou A 2017 Inflammatory peroxidases promote breast cancer progression in mice via regulation of the tumour microenvironment. *Int J Oncol.* 4:1191-1200
41. Panzer A, Viljoen M 1997 The validity of melatonin as an oncostatic agent. *J Pineal Res.* 4:184-202
42. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M 1977 Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 2:327-36
43. Razavi P, Devore EE, Bajaj A, Lockley SW, Figueiro MG, Ricchiuti V, Gauderman WJ, Hankinson SE, Willett WC, Schernhammer E. Shift Work, Chronotype, and Melatonin Rhythm in Nurses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019
44. Santoro R, Mori F; Marani M; Grasso G; Cambria MA, Blandino G; Muti P; Strano S 2013 Blockage of melatonin receptors impairs p53-mediated prevention of DNA damage accumulation. *Carcinogenesis.* 34: 1051–1061
45. Shah PN, Mhatre MC, Kothari LS 1984 Effect of melatonin on mammary carcinogenesis in intact and pinealectomized rats in varying photoperiods. *Cancer Res.* 8:3403-7.

46. Shen YQ, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido J, García-López S, Martínez-Ruiz L, Mendivil-Perez M, Soto-Mercado V, Acuña-Castroviejo D, Ortega-Arellano H, et al. 2018 Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. *J Pineal Res.* 64(3)
47. Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT 1994 Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl).* 116(1):56-64
48. Soussi T 2000 p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res.* 7:1777-88
49. Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B 1981 Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.* 1:4432-6
50. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ 2015 Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules.* 10:18886-906
51. Tchekalarova J, Nenčovska Z, Atanasova D, Atanasova M, Kortenska L, Stefanova M, Alova L, Lazarov N 2016 Consequences of long-term treatment with agomelatine on depressive-like behavior and neurobiological abnormalities in pinealectomized rats. *Behav Brain Res.* 302:11-28
52. Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sci.* 2017; 173:94-106

53. Valente VB, Verza FA, Lopes FYK, Ferreira JZ, Dos Santos PSP, Sundefeld MLMM, Biasoli ÉR, Miyahara GI, Soubhia AMP, de Andrade M, de Oliveira SHP, et al. 2018 Stress hormones concentrations in the normal microenvironment predict risk for chemically induced cancer in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 89:229-238
54. Valentine JA, Scott J, West CR, St Hill CA 1985 A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol*.14(8):654-65
55. van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE 1997 Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol*. 5:291-301
56. Wang X, Wang B, Xie J, Hou D, Zhang H, Huang H 2018 Melatonin inhibits epithelial- to- mesenchymal transition in gastric cancer cells via attenuation of IL- 1 β /NF- κ B/MMP2/MMP9 signaling. *Int J Mol Med*. 4:2221-2228
57. Wang X, Wang B, Zhan W, Kang L, Zhang S, Chen C, Hou D, You R, Huang H 2019 Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer in vivo. *Biomed Pharmacother*. 117:109018
58. Wight AJ, Ogden GR 1998 Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol*. 1998; 6:441-7.
59. Wongsena W, Charoensuk L, Dangtakot R, Pinlaor P, Intuyod K, Pinlaor S 2018 Melatonin suppresses eosinophils and Th17 cells in hamsters treated with a combination of human liver fluke infection and a chemical carcinogen. *Pharmacol Rep*.1:98-105.
60. Yang CY, Lin CK, Tsao CH, Hsieh CC, Lin GJ, Ma KH, Shieh YS, Sytwu HK, Chen YW 2017 Melatonin exerts anti-oral cancer effect via suppressing

LSD1 in patient-derived tumor xenograft models. *Oncotarget*. 20:33756-33769.

61. Yeh CM, Lin CW, Yang JS, Yang WE, Su SC, Yang SF 2016 Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. *Oncotarget*. 7:21952–21967

62. Zhang Y, Xiao G, Wang R 2019 Clinical significance of systemic inflammation index (SII) and C-reactive protein-to-albumin ratio (CAR) in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. *Cancer Manag Res*. 11:4185-4200

Anexo A

Anexo A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise dos efeitos da supressão de melatonina sobre a carcinogênese bucal quimicamente induzida em ratos: Estudo histopatológico, imunoistoquímico, molecular e comportamental", Processo FOA nº 00522-2017, sob responsabilidade de Daniel Galera Bernabé apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Outubro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Agosto de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Analysis of melatonin suppression on chemically induced oral carcinogenesis in rats: Histopathological, immunohistochemical, molecular and behavioral study.", Protocol FOA nº 00522-2017, under the supervision of Daniel Galera Bernabe presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 30, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Anexo B

Anexo B

Online ISSN: 1479-6821

Endocrine-Related Cancer

Impact factor: 4.77

Editor in-Chief: Charis Eng

[http:// https://erc.bioscientifica.com/](http://https://erc.bioscientifica.com/)

Acesso em: 17-08-2019

