

## Efeito do tratamento com melatonina sobre o potencial metastático de células de carcinoma ovariano.

**Renan Aparecido Vígaro**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração  
Biologia Estrutural e Funcional.

*Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida  
Chuffa.*

**BOTUCATU – SP**

**2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito do tratamento com melatonina sobre o potencial  
metastático de células de carcinoma ovariano

**Renan Aparecido Vígaro**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração  
Biologia Estrutural e Funcional.

*Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa*

**BOTUCATU – SP**  
**2023**

V672e

Vígaro, Renan Aparecido

Efeito do tratamento com melatonina sobre o potencial metastático de células de carcinoma ovariano. / Renan Aparecido Vígaro. -- Botucatu, 2023

44 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

1. Câncer. 2. Biologia Celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu grande e eterno herói, meu Pai.  
Aquele que dedicou todas as horas da sua vida para seus filhos.

*“Não me deixe rezar por proteção contra os perigos, mas pelo destemor de enfrentá-los.*

*Não me deixe implorar pelo alívio da dor, mas pela coragem de vencê-la.*

*Não me deixe procurar aliados na batalha da vida, mas a minha própria força. ”*

*(Rabindranath Tagore)*

## **Agradecimentos**

Agradeço!

Agradeço profundamente ao nosso grande arquiteto, que nos presenteia com o existir.

Agradeço aos amigos, aos que riram e choraram comigo.

Agradeço minha família, por sempre estarem comigo em todos os momentos.

Gratidão aos que muito me ajudaram nessa jornada, em especial Thaisy Dellaqua e Henrique Spaulonci, que sem os eles esse trabalho não seria possível.

Agradeço ao meu orientador Luiz Gustavo de Almeida Chuffa, pela oportunidade de estar caminhando no mundo acadêmico.

Muita Gratidão a Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ e seus mestres, por tanto.

Gratidão a CAPES, que financiou esse trabalho e que é a grande engrenagem que movimenta a pesquisa em nosso país.

Por fim, sou grato por haver motivos a serem gratos no meu existir atual.

## Sumário

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
<i>Capítulo 1</i> .....	8
1. Introdução .....	8
1.1. Câncer de ovário: incidência e subtipos .....	8
1.2. Câncer de Ovário e a transição epitélio-mesênquima: alvos moleculares potenciais .....	10
1.3. Câncer de Ovário e o relógio biológico molecular: um link potencial na agressividade tumoral.....	11
1.4. Melatonina: efeito antitumoral e envolvimento no processo metastático do CO .	13
2. Relevância e Justificativa do Tema .....	16
3. Hipótese.....	16
4. Objetivo Geral .....	16
5. Objetivos específicos .....	17
Referências bibliográficas .....	18
<i>Capítulo 2 (Artigo científico)</i> .....	23
1.INTRODUÇÃO .....	25
2.METODOLOGIA .....	26
2.1.Linhagem celular.....	26
2.2.Cultura celular .....	26
2.3.Delineamento experimental .....	26
2.4.Teste de Viabilidade Celular .....	27
2.5.Ensaio de Migração e Invasão Celular por Câmara de <i>Boyden</i> .....	27
2.6.Ensaio de Resistencia a Anoikis .....	27
2.7.Ensaio de citotoxicidade por MTT.....	28
2.8.Análise e quantificação de E-caderina e da proteína relógio Per-2 por Western Blot	28
2.9.Análise da expressão gênica.....	29
2.10. Forma de análise dos resultados.....	30
3.RESULTADOS .....	31
3.1.Baixa concentração de melatonina promove citotoxicidade em células de carcinoma ovariano .....	31
3.2.Baixas concentrações de melatonina atenuam o potencial migratório e invasivo de células SKOV-3 independente dos receptores MT1 e MT2 .....	32
3.3.A melatonina não altera a resistência a Anoikis das células de CO.....	33
3.4.A melatonina regula a expressão dos genes relacionados com TEM .....	33

3.5.A melatonina aumenta os níveis das proteínas E-caderina e Per-2 nas células de CO	34
4.DISSCUSSÃO.....	35
5.CONCLUSÃO .....	38
Referências .....	38

## RESUMO

O câncer de ovário (CO) é a quinta causa de morte por câncer no mundo. O CO possui uma alta taxa de malignidade pelo seu diagnóstico tardio, sendo muitas vezes confundido com outras patologias ginecológicas, apresentando alta incidência no período pós-menopausa, quando há a senescência ovariana. A transição epitélio-mesenquimal é um processo pela qual a célula epitelial polarizada sofre uma conversão fenotípica para invadir, migrar e gerar metástase em órgãos distantes. A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina), hormônio secretado pela glândula pineal, exerce inúmeras funções antioxidantes, antitumorais e imunomodulatórias, e o baixo nível de melatonina na célula tumoral pode estar relacionado com a progressão tumoral. O presente trabalho evidenciou o potencial da melatonina como agente antitumoral e antimetastático em células de câncer de ovário (linhagem SKOV-3) e testou se os efeitos são dependentes do receptor de membrana MT1. Para tanto, as células de CO foram expostas a concentração próxima da fisiológica de 3,4  $\mu$ M (IC50), por um período de 24 h. Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros pós-tratamento: contagem celular, ensaio de MTT, ensaio de *anoikis*, teste de invasão e migração celular, ensaios de *western blotting* para imunexpressão da proteína E-caderina e Per-1, além da expressão gênica para vimentina, twist e e-caderina, moléculas envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (TEM). A melatonina demonstrou efetividade para modulação dos genes estudados, reduzindo a expressão de *Vimentina* e *Twist* independente do receptor MT1; esses genes estão relacionados com mudança de fenótipo celular, perdendo característica epitelial e ganhando característica mesenquimal, facilitando a TEM. A melatonina regulou de forma positiva o gene *CDH1* e a proteína E-caderina, responsáveis pela ancoragem celular, de maneira dependente de seu receptor MT1. Além disso, a melatonina foi efetiva na diminuição do potencial invasivo e migratório das células de CO, independentemente de seu receptor MT1. Assim, a melatonina diminui fatores relacionados com a perda de fenótipo epitelial e aumenta fatores de ancoragem, sem, no entanto, afetar a resistência a *anoikis*. A melatonina auxilia na atenuação da TEM, mesmo em baixas concentrações em período de exposição de 24 h, podendo ser um aliado importante na terapia contra o CO.

**Palavras-chave:** Câncer de Ovário, melatonina, transição epitélio-mesenquimal, E-caderina, Per-1 Vimentina, sobrevivência celular.

## **ABSTRACT**

Ovarian cancer (OC) is the fifth leading cause of cancer death worldwide. OC has a high rate of malignancy due to its late diagnosis, and is often confused with other gynecological pathologies, with a high incidence in the postmenopausal period, when there is ovarian senescence. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process by which the polarized epithelial cell undergoes a phenotypic conversion to invade, migrate, and metastasize to distant organs. Melatonin (N-acetyl-5-methoxy-tryptamine), a hormone secreted by the pineal gland, has a variety of antioxidant, antitumor and immunomodulatory functions, and the low level of melatonin in tumor cells may be related to tumor progression. The present work investigated the potential of melatonin as an antitumor and antimetastatic agent by regulating EMT in ovarian cancer cells (SKOV-3) and tested if melatonin's actions are MT1 receptor dependent. For this purposes, OC cells were exposed to a concentration close to the physiological one of 3.4  $\mu$ M (IC50), in a period of 24 h. Thus, the following post-treatment parameters were evaluated: cell count, MTT assay, anoikis assay, cell invasion and migration test, western blotting assays for E-cadherin and Per-1 protein immunoexpression, in addition to gene expression for vimentin, twist and e-cadherin, molecules involved in the EMT). Melatonin was effective in reducing the expression of Vimentin and Twist regardless of the MT1 receptor; these genes are related to a change in cell phenotype, losing the epithelial characteristics and gaining mesenchymal phenotype, thus facilitating EMT. Melatonin positively regulated both the *CDH1* gene and E-cadherin protein, which are responsible for cell anchorage in a MT1 dependent manner. Also, melatonin promoted a reduction in the invasive and migratory potential of cells, regardless of its MT1 receptor. Thus, melatonin reduces factors related to the loss of epithelial phenotype while increasing anchoring factors, without affecting *anoikis* resistance. The melatonin's effects helped to reduce EMT-related molecules, even at low concentration in a short period of exposure, potentially serving as a therapeutic agent for OC management. doses it manages to produce a cytotoxic factor for cells in a 24-hour period, it

**Keywords:** Ovarian cancer, melatonin, epithelial-mesenchymal transition, Vimentin, E-cadherin, cell survival.

## *Capítulo 1*

### **1. Introdução**

#### **1.1. Câncer de ovário: incidência e subtipos**

O câncer de ovário (CO) é a quinta causa morte por câncer no mundo (Siegel. R.L et al., 2022). Segundo dados do Inca (Instituto Nacional do Câncer), o câncer de ovário é o sétimo mais incidente no Brasil, havendo 6.650 novos casos a cada 100,000 mulheres entre os anos de 2020 a 2022. Alguns dos principais fatores de risco associado ao CO estão relacionados com menopausa tardia, menarca precoce, reposição hormonal, número de gestações, fatores genéticos, entre outros. Outros fatores como consumo de álcool, obesidade e tabagismo, podem também aparecer como fatores de risco, porém com menor frequência (Brett et al. 2017; La vecchia 2017).

Quando diagnosticado tardiamente, o CO encontra-se em estado avançado podendo migrar e disseminar para a cavidade abdominal e outras regiões, resultando em altas taxas de mortalidade (Cannistra 1993; Armstrong et al., 2006). Os fatores

associados a pós-menopausa como a senescência ovariana, redução de esteroides hormonais, depleção de oócitos e aumento de gonadotrofinas circulantes, favorecem a incidência de CO (Vanderhyden, 2005). Pacientes em estágio III ou IV do câncer ovariano tem apresentado sobrevida de apenas 20% dos casos, mesmo com as terapias atuais como cirurgias e quimioterapia com derivados do taxol e da platina (Armstrong et al., 2006; Kurman & Shih, 2008). Contribuem também para a oncogênese ovariana o processo ovulatório incessante, associado à inflamação crônica e a exposição aos carcinógenos ambientais (Ness & Cottrau., 1999; Hamilton et al.,2002).

O CO é classificado em tipo I e tipo II. O tipo I se assemelha a muitos tipos de cânceres epiteliais, se desenvolvendo por meio de lesões que vão acontecendo de uma forma progressiva e gradual em células limítrofes ou em células que apresentam características pré-malignas; clinicamente, se apresentam de forma unilateral, cística e de fácil acesso com bom prognóstico. Do ponto de vista molecular, possui o gene *TP53* intacto e alteração oncogênica em vias de sinalização celular como PI3K-AKT e RAS-MAPK, (Kurman, R.J & Shih Ie. M., 2016). Por sua vez, o tipo II é mais agressivo se desenvolvendo mais rapidamente e, quando diagnosticado, já se encontra disseminado, revelando um prognóstico ruim. Geneticamente, esse subtipo possui mutação no gene *TP53* e, por possuir falhas no mecanismo de reparo celular, há uma instabilidade genômica, sendo responsável por 70% a 80% das mortes por CO (Kurman, R.J & Shih Ie. M., 2016; Bowtell. D.D et al., 2015).

O processo de metástase intra-abdominal a partir do CO tende a ser muito rápido, ocorrendo disfunção da cápsula tumoral liberando as células neoplásicas para a cavidade abdominal e metástase por extensão. Os órgãos abdominais podem ser acometidos, pois as células neoplásicas são capazes de sobreviver em suspensão no líquido peritoneal, individualizadas ou agregadas, aderindo ao mesotélio (Ahmed N, et al., 2013; Ahmed N, et al., 2007). A ascite maligna é comum nesses casos, pois as células ao se espalhar acabam obstruindo os vasos linfáticos, gerando uma excessiva exsudação por conta de neovascularização e microvascularização (Ahmed N, et al., 2013). A disseminação das células neoplásicas para região peritoneal acomete cerca de dois terços das pacientes com CO, uma vez que é assintomático e de diagnóstico tardio (TRILLSCH., 2016).

A terapia padrão para o CO utiliza derivados de platina e/ou taxol, onde os tumores serosos e endometrióide têm taxa de resposta em aproximadamente 80% dos tratamentos (Cloven et al., 2004; Ho et al., 2004). De forma consistente, muitos pacientes em terapia padrão têm apresentado quimioresistência, resultando em

recorrência da doença e tornando-a incurável (Berek et al., 1999). Outros estudos apontam forte relação entre inflamação, quimioresistência e progressão do câncer (Balkwill & Coussens, 2004; Chen et al., 2007). A quimioresistência acomete a maioria dos pacientes com CO, levando a recorrência e prognóstico ruim da doença (Berek et al., 1999)

## **1.2. Câncer de Ovário e a transição epitélio-mesênquima: alvos moleculares potenciais**

O processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) é responsável pela maioria das mortes por câncer, pois as células ganham capacidade migratória, se despreendendo do epitélio de origem caindo na corrente sanguínea, sofrendo mudanças moleculares e fisiológicas importantes como mudança no citoesqueleto e fatores de adesão, podendo sobreviver em outras regiões (Coghlin, C.& Murray G.I. 2010). A TEM de células cancerosas é um dos principais fatores que aumentam a metástase de vários tipos de câncer, incluindo o CO (Choi MJ, et al. 2015). Para que a TEM aconteça, diversos alvos moleculares são alternadamente regulados como Twist e E-Caderina que usam vias de sinalização envolvidas com a progressão do CO (Shixia Bu., et al., 2020).

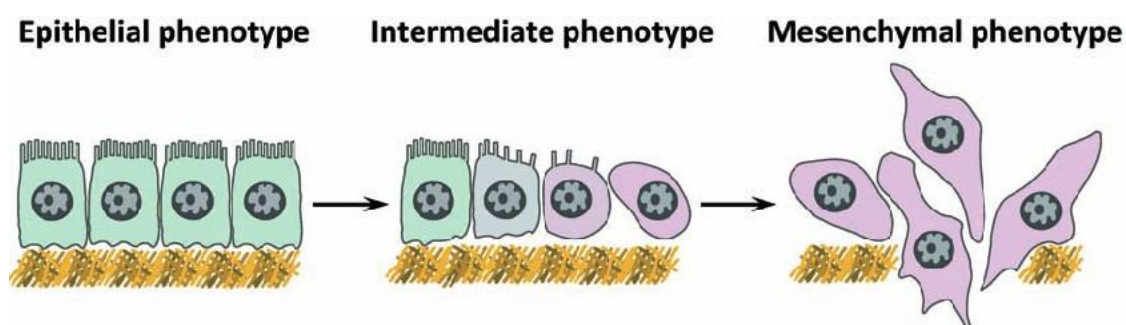
Em células de câncer de mama é encontrado um número maior da proteína Twist, haja vista que a mesma se liga a proteína Slug, que estimula sua expressão e aumenta a probabilidade da TEM (Casas, E. 2011; Yang J. et al., 2004). As proteínas Slug e Snail apresentam alta expressão em células de CO, indicando maior potencial de invasão e metástase em linfonodos. Estudos em células SKOV-3 mostraram que o aumento desta proteína está relacionada com a migração celular (Chuffa. L.G. A et al., 2017). Estudos com camundongos mostraram um grande nível de Twist em células ductais de câncer de mama (Hüseemann Y. et al. 2008). Quando encontrada no citoplasma, a proteína Twist ajuda a manter as características de uma célula neoplásica epitelial, enquanto quando está no núcleo promove metástase e aumento de  $\beta$ -catenina, facilitando a TEM (Li. X. et al., 2016).

As E-caderinas são moléculas de adesão celular, responsáveis pela conexão celular entre células epiteliais, resultando na manutenção do fenótipo dessas células (Lamouille. S. et al., 2014). Essas moléculas estão associadas com um grupo de proteínas intracelulares chamadas cateninas, as quais se ligam aos microfilamentos de actina do citoesqueleto, regulando mecanismos transdutores de sinais relacionados com

o crescimento e diferenciação celular (Ozawa & Kemler, 1998). As moléculas de adesão clássicas incluem a E-caderina, N-caderina e a P-caderina (Foty & Steinberg, 2004).

O Twist é responsável por vários fatores relacionados ao processo tumoral, como aumento da resistência a apoptose, manutenção de células-tronco tumorais; quando expresso, atua de maneira negativa sobre a E-caderina, diminuindo a ancoragem celular (Khan, M. A., et al., 2013). O gene que codifica a vimentina (*VIM*) é altamente expresso em células cancerígenas mesenquimais, facilitando o processo da TEM de acordo com a mudança de fenótipo de epitelial para mesenquimal (Zhao, L., et al., 2018).

Quando a TEM acontece, as células epiteliais perdem seu fenótipo, ganhando forma e função de células mesenquimais migratórias e invasivas (Figura 1), tornando possível o desprendimento dessas células do parênquima tecidual e favorecendo a metástase (Nawshad. A et al., 2005). Estudos sugerem que células de CO que apresentam menor expressão das proteínas E-caderinas, por se desprenderem facilmente do tecido de origem, são geralmente células com maior potencial de malignidade e se apresentam em maior número quando comparado com tecidos saudáveis (Shixia Bu et al., 2020).

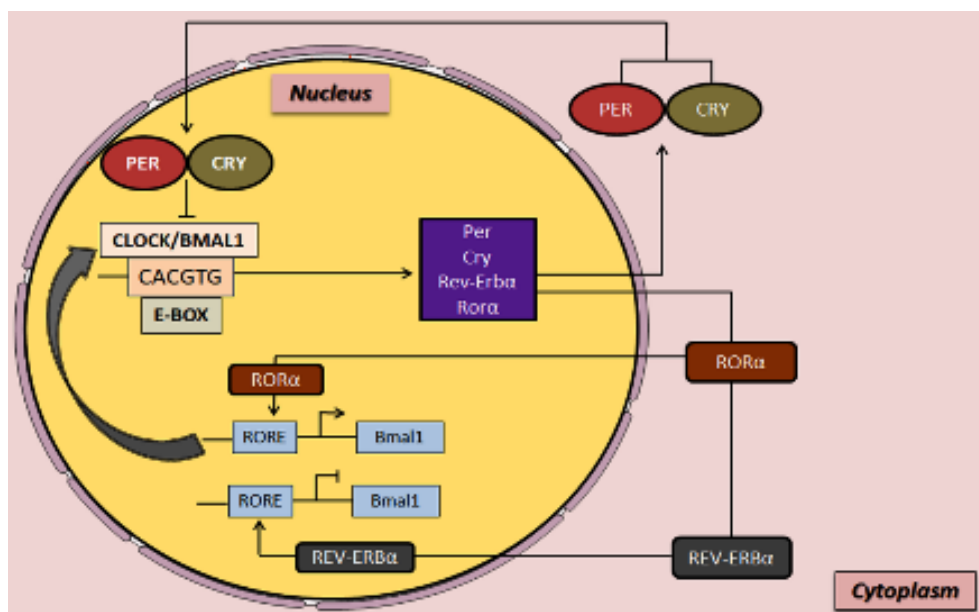


**Figura 1.** Células epiteliais passando pela mudança de fenótipo, de epiteliais para mesenquimais. (Adaptado de Jobe N P et al., 2014).

### **1.3. Câncer de Ovário e o relógio biológico molecular: um link potencial na agressividade tumoral**

Um dos fatores que também está relacionado com progressão do câncer é a falha da regulação de moléculas-relógio que ditam grande parte dos eventos celulares. O ritmo biológico das atividades celulares tem um período de aproximadamente 24 horas e em mamíferos é controlado pelo relógio biológico localizado no sistema nervoso central,

especificamente no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, e também nos tecidos periféricos por osciladores periféricos que se ajustam de maneira continuada (Lowrey & Takahashi., 2011, Kassi et al., 2013). Os relógios circadianos possuem um conjunto de genes que funcionam por meio de “loops” e “feedback” transcricional e traducional (Bue. et al., 2013, Partch. et al., 2014). Resumidamente, os genes CLOCK e BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein 1) formam um heterodímero transcricional para a expressão dos genes Per (period – Per 1,2,3), Cry (cryptochrome – Cry1 e 2) e do receptor órfão, REV-ERB. Os genes PER e CRY formam oligômeros que, por sua vez, são transportados para o núcleo, participando da repressão de CLOCK/BMAL1 e inibindo a sua própria síntese. No “loop” menor, quando a proteína REV-ERB está ausente, o gene BMAL1 é estimulado pela ativação do receptor ROR, favorecendo novamente a formação do fator transcricional CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo (Albrecht & Eichele, 2003). Esse ciclo circadiano geralmente tem início nas primeiras horas da manhã após ativação de Per e Cry pelo dímero CLOCK/BMAL1. A Figura 2 representa, de forma esquemática, o mecanismo de atuação dos genes-relógio atuando no núcleo e citoplasma das células.



**Figura 2.** Maquinaria molecular dos genes relógio ilustrando a ativação e repressão dos genes CLOCK/BMAL1 pelos seus produtos Per e Cry, e a atuação de ROR $\alpha$  e VER-ERB $\alpha$  ativando e inibindo BMAL1.. (Adaptado de Chuffa et al., 2019).

O gene PER é responsável pela regulação de vários processos internos em resposta a luminosidade, a temperatura e o ciclo sono e vigília (Dijk & Archer., 2010; Hida et al., 2015). Os genes relógios podem estar relacionados ao processo de carcinogênese, por fazer parte do processo de regulação no reparo de excisão de nucleotídeos, ciclo celular, apoptose e pontos de verificação de danos ao DNA (Chuffa. L G.A et al., 2021).

Resultados de estudos in vitro e in vivo demonstraram que os genes-relógio estão associados à carcinogênese (Sahar. Et al.,2009, Sancar et al., 2015). A inibição do crescimento celular acontece quando há uma superexpressão do gene BMAL-1, apresentando também uma diminuição da resistência a quimioterápicos, como a cisplatina em CO; portanto, a modulação de BMAL-1 é uma possível alternativa epigenética para supressão de CO, uma vez que BMAL-1 silencia a metilação do promotor de modificação de histonas (YEH et al., 2014). Quando o índice de produção de melatonina foi correlacionado com expressão de PER e BMAL1, uma correlação positiva foi observada em tumores reprodutivos femininos incluindo o CO, mostrando que esses genes podem atuar como supressores tumorais (Chuffa. L G.A et al., 2021).

#### **1.4. Melatonina: efeito antitumoral e envolvimento no processo metastático do CO**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal, podendo ser também secretada por outros tecidos extrapineas como ovário, retina e trato gastrointestinal (Reiter RJ et al., 2016). Sua síntese ocorre através da conversão de serotonina, que é acetilada em N-acetilserotonina (NAS), sendo essa reação catalisada pela enzima aril-alquil-amina N-acetiltransferase (AA-NAT) e a enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (ASMT), formando a melatonina (ESPINO et al., 2012; AL-OMARY, 2013). O papel mais conhecido da melatonina em um organismo é o controle e manutenção do sono, diminuição do estresse oxidativo e aumento de enzimas antioxidantes (Gandhi et al., 2015; Reiter et al., 2016; Tan et al., 2013; Tosches et al., 2014).

Estudos comprovaram que o uso de melatonina em conjunto com tratamentos convencionais apresentam efeitos benéficos contra processos metastáticos em diferentes tipos de tumores (Lissoni et al., 1995; Lissoni et al., 1996). Em células saudáveis, o papel da melatonina é prevenir a apoptose, já em células tumorais pode ter efeito pró-

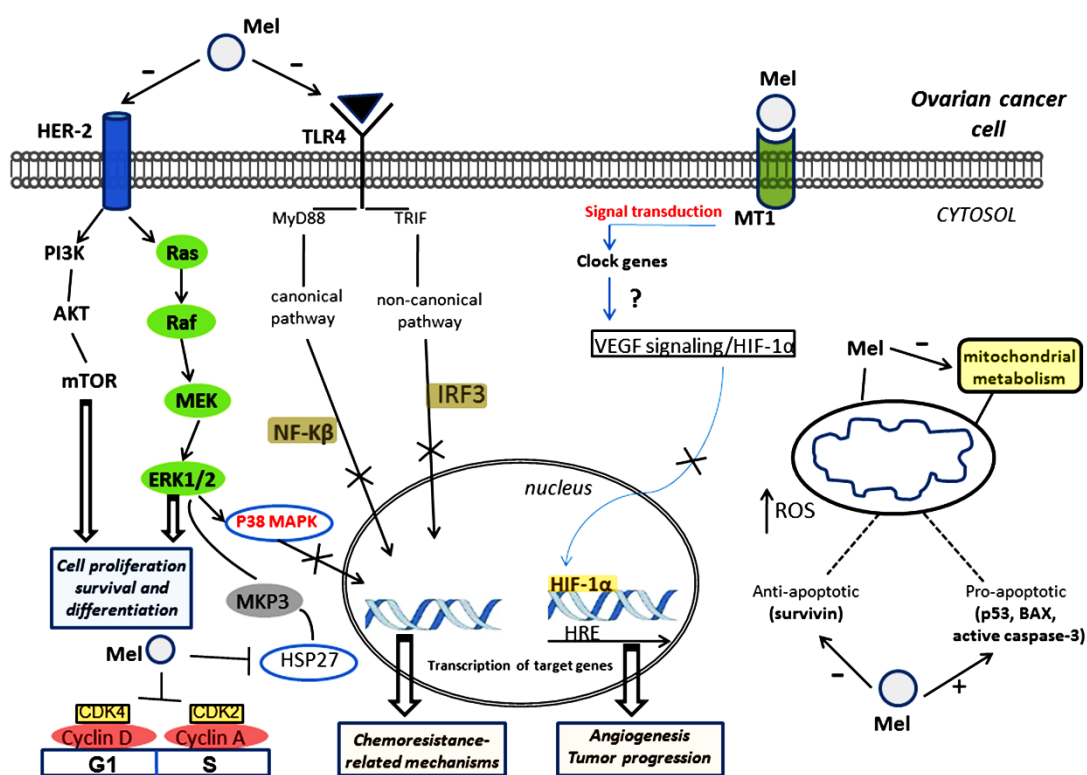
apoptótico e imunomodulador (Reiter et al., 2016., Chuffa. L.G. A et al., 2015). Alguns mecanismos moleculares da melatonina envolvem ação oncostática através da regulação de receptores de estrógeno, regulação do citoesqueleto, regulação de expressão de proteínas quinases ativas, cálcio e calmodulina. Além disso, atua contra a proliferação celular, angiogênese e indução do processo de apoptose (Blask, D.E et al., 2002; Menéndez-Menéndez, Martinez Campa., 2018). A melatonina possui alta capacidade de eliminar radicais livres, enquanto controla a iniciação de tumores, sendo possível sua utilização como agente quimiopreventivo (Aschauer; Mullr.,2006; Reiter et al., 2017). A terapia com melatonina em longo prazo tem mostrado regulação negativa em proteínas anti-apoptóticas (BCL-2 e survivina) e positiva em proteínas pro-apoptóticas (p53, BAX e CASPASE-3) em experimentos in vivo. Em modelos experimentais envolvendo o CO papilífero seroso, o tratamento com melatonina promoveu aumento de expressão de p53, BAX e CASPASE-3, enquanto induziu a fragmentação de DNA que foi observado pelo teste de TUNEL (Chuffa L.G A et al., 2016).

A TEM está relacionada diretamente com o processo de metástase, uma vez que células neoplásicas se desprendem do tecido de origem podendo se alojar em qualquer parte de um sistema vivo, e alguns fatores de indução são responsáveis por esse mecanismo molecular, sendo eles Twist, Snail, Slug e as  $\beta$ -cateninas (Choi et al., 2015). Interessantemente, a terapia com melatonina utilizada em camundongos inoculados com células-tronco derivadas de SKOV-3 mostrou resultados relevantes na diminuição das proteínas Twist, Snail e Slug que são relacionadas com migração celular, sendo responsáveis por mecanismos moleculares relacionados com junção célula-célula e célula-tecido (Bu. S et al., 2020). No entanto, a influência da melatonina em cultura celular envolvendo o CO de alto e baixo grau não foi ainda elucidada. Os efeitos pro-oxidativos, imunoregulatórios e antimetastáticos da melatonina são considerados promissores no tratamento do CO (CHUFFA. L. G. A. et al., 2017).

A melatonina sinaliza através de receptores de membrana ativados por proteína G como o MT1 e MT2 que, quando ativados pela melatonina e derivados, desencadeia sinalização intracelular via cAMP, aumentando o potencial antiproliferativo em várias neoplasias (JABLONSKA, et al., 2014).

A diminuição de produção de melatonina, de forma não circadiana, está relacionada ao desenvolvimento de câncer (Reiter RJ et al., 2007). Uma hipótese que tem sido aventada é de que no período diurno, o CO apresenta uma maior agressividade quando comparado ao período noturno, podendo ser associado ao baixo nível de

produção de melatonina durante o dia e o aumento da mesma no período noturno (Reiter RJ et al., 2021). A melatonina está envolvida em mecanismos importantes que controlam e alteram a função dos genes relógios nas células (Vriend.J & Reiter. R.J., 2015). Estudos revelaram que a alteração na produção de melatonina interfere na expressão de genes PER e BMAL-1, que por sua vez, atuam como supressores tumorais em inúmeros tipos de cânceres (Chuffa et al., 2019). Tendo em vista o papel multitarefa da melatonina nos mecanismos moleculares da célula de CO que inclui ações anti-inflamatórias, pro-apoptótica, anti-angiogênica e anti-proliferativa (Figura 3), esperamos contribuir com o entendimento da parte dos mecanismos associados a TEM.



**Figura 3.** Representação esquemática do papel da melatonina em diferentes alvos terapêuticos em células de CO. A melatonina tem ações de membrana e intracelulares que levam à inibição da proliferação celular, sobrevivência, migração, inflamação e angiogênese relacionada ao CO. Essa regulação pode envolver diretamente alvos intracelulares ou pode ocorrer indiretamente via receptores MT1. Sinais negativos ou positivos indicam regulação negativa ou regulação positiva resultante da terapia com melatonina. (Adaptado de Chuffa et al. 2016)

## **2. Relevância e Justificativa do Tema**

Há tempos, o CO tem sido associado com o potencial metastático de suas células malignas, causando implantes peritoneais e promovendo disseminação para sítios distantes no organismo. Mais recentemente, a descrição do mecanismo de sinalização celular revelou importantes moléculas envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (TEM). A melatonina tem função antitumoral e já apresentou resultados positivos em relação ao CO, atuando em vias relacionadas com proliferação, diferenciação, apoptose e resistência aos tratamentos convencionais (DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2018). Em modelo experimental de CO associado ao estresse, ela demonstrou habilidade de regular alguns marcadores de TEM, atenuando a capacidade migratória dessas células. No entanto, ainda não foi documentado como a melatonina atua independentemente nas células SKOV-3. O presente estudo testou os efeitos da melatonina isolada, em concentrações próximas a fisiológica, nas células de câncer de ovário (SKOV-3), em relação ao seu potencial anti-metastático, e verificou se o mecanismo é dependente ou não do receptor MT1 e MT2.

## **3. Hipótese**

Sabendo que as células de CO possuem grande facilidade de migração e invasão através de alterações iniciais na regulação da transição epitélio-mesenquimal, espera-se que a melatonina, um hormônio que já demonstrou importante papel regulador em vários processos celulares contra a metástase tumoral, atenuar vias moleculares relacionadas com o processo de TEM nas células de CO.

## **4. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do tratamento com melatonina, utilizando concentrações próximas a fisiológica, sobre a via de sinalização envolvida na transição epitélio-mesenquimal e sobre a proteína relógio Per-2 nas células de CO humano (linhagem SKOV-3).

## 5. Objetivos específicos

Os objetivos específicos estão definidos dentro das diferentes técnicas empregadas:

- 1) Avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade das células de CO através do ensaio de MTT com base em diferentes concentrações de tratamento e períodos de exposição, para testar a melhor concentração de melatonina;
- 2) Realizar ensaio de migração e invasão celular após tratamentos com diferentes concentrações de melatonina para avaliar sua regulação potencial no processo metastático;
- 3) Analisar a expressão gênica por RT-qPCR dos genes E-caderina, Vimentina e Twist, para verificar se a melatonina exerce papel na inibição da expressão desses genes.
- 4) Quantificar as proteínas E-caderina e Per2por Western Blot, envolvidas na regulação da TEM;
- 5) Analisar a resistência a *anoikis* das células SKOV-3, para verificar se a melatonina é capaz reverter esse processo.

## Referências bibliográficas

- AHMED, Nuzhat; STENVERS, Kaye. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 256, 2013.
- AHMED, Nuzhat; STENVERS, Kaye. Conhecendo a ascite do câncer de ovário: oportunidades para pesquisas translacionais baseadas em terapia direcionada. **Frontiers in oncologia**, v. 3, p. 256, 2013.
- ALBRECHT, Urs; EICHELE, Gregor. The mammalian circadian clock. **Current opinion in genetics & development**, v. 13, n. 3, p. 271-277, 2003.
- AL-OMARY, Fatmah AM. Melatonina: perfil abrangente. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 38, p. 159-226, 2013.
- ALONSO-GONZÁLEZ, Carolina et al. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 52, n. 2, p. 560-570, 2018.
- Armstrong, Deborah K., et al. "Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer." *New England Journal of Medicine* v. 354, n.1, p. 34-43.
- BALKWILL, Fran; COUSSENS, Lisa M. An inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 405-406, 2004.
- BEREK, J. S. et al. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements. **Annals of oncology**, v. 10, p. S87-S92, 1999.
- BLASK, David E.; SAUER, Leonard A.; DAUCHY, Robert T. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 113-132, 2002.
- BOWTELL, David D. et al. Repensando o câncer de ovário II: reduzindo a mortalidade por câncer de ovário seroso de alto grau. **Nature reviews Cancer**, v. 15, n. 11, pág. 668-679, 2015.
- Bu, Shixia, Wang, Qian, Sun, Junyan, Li, Xiao, Gu, Tingting, Lai, Dongmei. Melatonin suppresses chronic restraint stress-mediated metastasis of epithelial ovarian cancer via NE/AKT/ $\beta$ -catenin/SLUG axis. **Cell Death and Disease**, v.11, n. 8, p.2-17, 2020.

CANNISTRA, Stephen A. Cancer of the ovary. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 21, p. 1550-1559, 1993

Casas, Esmeralda, et al. "Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. **Cancer research** v.71, n.1, p. 245-254, 2011.

CHEN, Ying-Li; LI, Qian-Zhong. Predição da localização subcelular da proteína de apoptose usando abordagem híbrida aprimorada e composição de pseudo-aminoácidos. **Jornal de biologia teórica** , v. 248, n. 2, pág. 377-381, 2007.

Choi, M. J., et al. "hTERT mediates norepinephrine-induced Slug expression and ovarian cancer aggressiveness.**Oncogene** v.34, n.26, p. 3402-3412, 2015.

CLOVEN, Noelle Gillette et al. In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 92, n. 1, p. 160-166, 2004.

CRISTANI, Marco et al. Human behavior analysis in video surveillance: A social signal processing perspective. **Neurocomputing**, v. 100, p. 86-97, 2013.

DE ALMEIDA CHUFFA, Luiz Gustavo et al. Clock genes and the role of melatonin in cancer cells: an overview. **Melatonin Research**, v. 2, n. 2, p. 133-157, 2019.

DE ALMEIDA CHUFFA, Luiz Gustavo et al. Clock genes and the role of melatonin in cancer cells: an overview. **Melatonin Research**, v. 2, n. 2, p. 133-157, 2019.

DIJK, Derk-Jan; ARCHER, Simon N. PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. **Sleep medicine reviews**, v. 14, n. 3, p. 151-160, 2010.

FOTY, Ramsey A.; STEINBERG, Malcolm S. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 397-409, 2004.

GEYFMAN, Mikhail et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11758-11763, 2012.

GRÉCHEZ-CASSIAU, Aline et al. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 8, p. 4535-4542, 2008.

HÜSEMANN, Yves et al. A disseminação sistêmica é uma etapa inicial do câncer de mama. **Célula cancerosa** , v. 13, n. 1, pág. 58-68, 2008.

JABLONSKA, K. et al. Expression of the MT1 Melatonin Receptor in Ovarian Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 23074–23089, 12 dez. 2014.

Khan MA, Chen HC, Zhang D, Fu J (outubro de 2013). "Twist: um alvo molecular na terapêutica do câncer". **Biologia Tumoral**. 34

KURMAN, Robert J .; SHIH, Ie-Ming. O modelo dualístico da carcinogênese ovariana: revisitado, revisado e expandido. **The American Journal of Pathology** , v. 186, n. 4, pág. 733-747, 2016.

KURMAN, Robert J .; SHIH, Ie-Ming. Patogênese do câncer de ovário. Lições de morfologia e biologia molecular e suas implicações clínicas. **Jornal internacional de patologia ginecológica: jornal oficial da Sociedade Internacional de Patologistas Ginecológicos** , v. 27, n. 2, pág. 151, 2008.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rik. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.

Li, X., et al. "Role of TWIST2, E-cadherin and Vimentin in epithelial ovarian carcinogenesis and prognosis and their interaction in cancer progression." **Eur J Gynaecol Oncol** v.37, n.1, p.100-18, 2016.

LISSONI, P. et al. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. **British journal of cancer**, v. 71, n. 4, p. 854-856, 1995.

LISSONI, P. et al. A melatonina tem papel no tratamento da caquexia neoplásica ?. **European Journal of cancer** , v. 32, n. 8, pág. 1340-1343, 1996.

LOWREY, Phillip L.; TAKAHASHI, Joseph S. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. **Advances in genetics**, v. 74, p. 175-230, 2011.

MENG, Xiaodan et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16923, 2016.

NAWSHAD, Ali et al. Transforming growth factor- $\beta$  signaling during epithelial–mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. **Cells Tissues Organs**, v. 179, n. 1-2, p. 11-23, 2005.

OZAWA, Masayuki; KEMLER, Rolf. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of  $\alpha$ -catenin from the E-cadherin· catenin complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 11, p. 6166-6170, 1998

REITER, Russel J. et al. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n. 21, p. 3863-3881, 2017.

REITER, Russel J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of pineal research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

REITER, Russel J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of pineal research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

REITER, Russel J. et al. Luz à noite, cronodisrupção, supressão de melatonina e risco de câncer: uma revisão. **Critical Reviews™ em Oncogenesis**, v. 13, n. 4, 2007.

REITER, Russel J.; MA, Qiang; SHARMA, Ramaswamy. Melatonina nas mitocôndrias: mitigando perigos claros e presentes. **Physiology**, v. 35, n. 2, pág. 86-95, 2020.

REITER, Russel J.; SHARMA, Ramaswamy; MA, Qiang. Mudança de células doentes da glicólise aeróbia citosólica para fosforilação oxidativa mitocondrial: Um ritmo metabólico regulado pela melatonina?. **Journal of pineal research**, v. 70, n. 1, pág. e12677, 2021.

ROSENBERG, Steven A.; YANG, James C.; RESTIFO, Nicholas P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. **Nature medicine**, v. 10, n. 9, p. 909-915, 2004.

SAHAR, Saurabh; SASSONE-CORSI, Paolo. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 12, p. 886-896, 2009.

SANCAR, Aziz et al. Circadian clock, cancer, and chemotherapy. **Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 110-123, 2015.

Siegel, Rebecca L. Miller, Kimberly D. Fuchs, Hannah E. Jemal, Ahmedin: Cancer Statistics, 2021. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.

SIMÃO, Vinícius Augusto et al. Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods. **International journal of experimental pathology**, v. 96, n. 5, p. 338-349, 2015.

TOSCHES, Maria Antonietta et al. A sinalização da melatonina controla o comportamento de natação circadiano no zooplâncton marinho. **Cell**, v. 159, n. 1, pág. 46-57, 2014.

UGUZ, Abdulhadi C. et al. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 1, p. 91-98, 2012.

Vanderhyden BC. Loss of ovarian function and the risk of ovarian cancer. **Cell Tissue Res.** v.322, n.1, p.24, 2005.

VRIEND, Jerry; REITER, Russel J. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. **Journal of pineal research**, v. 58, n. 1, p. 1-11, 2015.

Yang, Jing, et al. "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell** v. 117,n.7, p. 927-939, 2004.

Zhao, L.; Zhang, P.; Su, X.-J.; Zhang, B. The ubiquitin ligase TRIM56 inhibits ovarian cancer progression by targeting vimentin. **J. Cell. Physiol.** 2018, 233, 2420–2425.

*Capítulo 2 (Artigo científico)*

**Efeito do tratamento com melatonina sobre a transição epitélio-mesenquimal em células de carcinoma ovariano** Renan Aparecido Vigaró<sup>1</sup>, Roberta Carvalho Cesário<sup>1</sup>, Henrique Spaulonci Silveira<sup>1</sup>, Thaisy Tino Dellaqua<sup>1</sup>, Russel J. Reiter<sup>2</sup>, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, UNESP - Sao Paulo State University, Botucatu, 18618-689, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Cell Systems and Anatomy, UT Health, San Antonio, TX 78229, USA.

**\*Corresponding author:**

Luiz Gustavo de Almeida Chuffa, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil, Zip Code: 510; P.O Box: 18618-689, Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP – Brazil, Phone: +55 (14) 3880-0027, Fax: +55 (14) 3811-6361. Email: [luiz-gustavo.chuffa@unesp.br](mailto:luiz-gustavo.chuffa@unesp.br)

## RESUMO

O câncer de ovário (CO) é a quinta causa morte por câncer no mundo. O CO possui uma alta taxa de malignidade onde a célula epitelial polarizada sofre uma conversão fenotípica para invadir, migrar e gerar metástase. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) já mostrou inúmeras funções antitumorais e o seu baixo nível na célula tumoral pode estar relacionado com a progressão tumoral. O presente trabalho investigou o potencial da melatonina na atenuação do processo metastático em células de CO (linhagem SKOV-3) expostas a concentração de 3,4  $\mu\text{M}$ , por um período de 24 h. Para avaliação dos parâmetros pós-tratamento foram utilizados: contagem celular, ensaio de MTT, teste de invasão e migração celular e anoikis, ensaios de western blot para imunexpressão da proteína E-caderina e Per-2, e avaliação da expressão genica para vimentina, twist e e-caderina. O ensaio de MTT demonstrou que a melatonina em baixas concentrações foi citotóxica a concentração de 3,4  $\mu\text{M}$ . A melatonina demonstrou efetividade na modulação dos genes estudados, reduzindo a expressão de *Vimentina* e *Twist* independente do receptor MT1; esses genes estão relacionados com mudança de fenótipo celular, perdendo característica epitelial e ganhando característica mesenquimal, facilitando a TEM. A melatonina regulou de forma positiva o gene *CDH1* e a proteína E-caderina, responsáveis pela ancoragem celular, de maneira dependente de seu receptor MT1. Além disso, a melatonina foi efetiva na diminuição do potencial invasivo e migratório das células de CO, independentemente de seu receptor MT1. A melatonina diminui fatores relacionados com a perda de fenótipo epitelial e aumenta fatores de ancoragem, sem, no entanto, afetar a resistência a *anoikis*. A melatonina auxilia na atenuação da TEM, mesmo em baixas concentrações em período de exposição de 24 h, podendo ser um aliado importante na terapia contra o CO.

**Palavras-chave:** Câncer de Ovário, melatonina, transição epitélio-mesenquimal, PER2, Vimentina, E-caderina, sobrevivência celular.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de ovário (CO) está entre os cânceres ginecológicos mais agressivos, sendo a quinta maior causa de morte por câncer (Siegel, R. L., et al., 2022). Em 2020, o CO foi o terceiro câncer ginecológico mais comum (Sung, H., et al., 2021). Sua prevalência está entre 60 e 70 anos, e o diagnóstico tardio ocorre em cerca de 70% dos casos, havendo apenas 40% de chance de cura (Clarke-Pearson, D. L., 2009; Matteson, K. A., et al., 2017; Siegel, R. L., et al., 2018; Torre, A. L., et al., 2018;). O mau prognóstico do CO pode ser decorrente de sintomas inespecíficos, quimioresistência e metástases (Bowtell, D. D., et al., 2015; Weidle, U. H., et al., 2016). O tratamento padrão para o CO inclui fármacos a base de platina como cisplatina e paclitaxel, e remoção cirúrgica, porém há muita recorrência devido a quimioresistência aos tratamentos (Cortez, A. J., et al., 2017).

As células que podem originar-se em células cancerosas são provenientes da camada granulosa, mesenquimais, germinativas e epiteliais (Chuffa, L. G. A., et al., 2017; Zare, H., et al., 2019). Uma célula epitelial pode passar para uma conversão mesenquimal ao se desprender de seu tecido de origem, levando as células patológicas para outros sítios, processo que se denomina transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Greening, D. W., et al., 2015; Vergara, D., et al., 2010). A E-caderina é uma molécula que está relacionada com a ancoragem celular, mantendo a célula aderida ao seu tecido de origem; quando sua expressão é reduzida, há o aumento de Twist e Vimentina, genes que auxiliam na perda de fenótipo de epitelial para ganho de fenótipo mesenquimal (Khan, M. A., et al., 2015).

Um importante aliado com potencial terapêutico para o CO é a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), que atua diminuindo o crescimento e o desenvolvimento de vários tipos tumorais (Sauer, L. A., et al., 2001). A melatonina (mel) é um hormônio sintetizado pela glândula pineal na fase de escuro, mas também em muitos outros órgãos, de maneira não circadiana, como no ovário (Tan, D. X., et al., 2016). A mel possui ação distinta em células saudáveis e em células tumorais, atuando como uma molécula anti-apoptótica para células saudáveis e pró-apoptóticas nas células tumorais (Chuffa, L. G. A., et al., 2019; Reiter, R. J., et al., 2016). A melatonina interage com a célula através dos seus receptores de membrana MT1 e MT2, receptores acoplado a proteína G, tendo alguns ligantes como a melatonina (Cardinali, D. P., et al., 2019). Notavelmente, o CO apresenta maior agressividade no período diurno, comparado ao período noturno, podendo ser associado aos diferentes níveis de melatonina, onde, por

sua vez, é produzida e liberada em maior quantidade no período noturno (Reiter, J., et al., 2016). A relação entre o tratamento com melatonina, administrada em concentrações mais próximas daquelas consideradas fisiológicas, e o processo metastático, ainda é pouco explorado na literatura. Portanto, o presente estudo investigou o efeito do tratamento com melatonina, em concentrações baixas, sobre o processo relacionado com a TEM envolvido na progressão do câncer de ovário.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Linhagem celular**

Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma de ovário humano (SKOV-3), uma linhagem de alta malignidade do tipo II, originária de adenocarcinoma resistente às quimioterapias convencionais contra o CO; essa célula é oriunda de uma paciente com ascite maligna e que vem sendo utilizada em diversos experimentos com diferentes tratamentos.

### **2.2. Cultura celular**

As células SKOV-3 (ATCC<sup>®</sup> HTB-77) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e acondicionadas em nosso laboratório. Após a aquisição, as mesmas foram cultivadas e amplificadas para a confecção de um banco de células. O cultivo das células ocorreu em meio RPMI (Gibco, Paisley, UK), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco) e penicilina a 100 UI/mL e 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Regularmente, as células foram expandidas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> de cultura de células (Costar, Cambridge, MA, EUA), com troca de meio-base de cultura a cada dois dias. O sobrenadante da cultura celular foi aspirado e as células, quando chegaram a confluência de 90%, foram incubadas com tripsina/EDTA (Gibco), para o bloqueio de sua aderência ao frasco de cultura. Após centrifugação, as células foram lavadas em meio de cultura base, ressuspensas e/ou congeladas para reutilização futura.

### **2.3. Delineamento experimental**

Para a investigação dos efeitos do tratamento com melatonina sobre a transição epitélio-mesenquimal na linhagem SKOV-3, o experimento foi dividido em quatro

grupos: Grupo Controle, células SKOV-3 mantidas em meio padrão RPMI e DMSO (veículo) por 24 h sem tratamento; Grupo Mel (3,4  $\mu$ M), células SKOV-3 foram tratadas com melatonina na concentração 3,4  $\mu$ M por 24 h; Grupo Luzindole, as células foram tratadas com 10<sup>-6</sup> M de luzindole por 24 h; Grupo Mel+Luz, as células foram tratadas com a associação dos dois agentes considerando a mesma concentração e procedimento dos grupos anteriores por 24 h.

#### **2.4. Teste de Viabilidade Celular**

Para determinação da viabilidade celular, as amostras foram analisadas antes da realização dos experimentos determinados anteriormente. Para isso, foram utilizadas 1,0x10<sup>6</sup>/mL de células as quais foram incubadas com solução de azul de Tripán (Merck) a 0,5% em solução salina fosfato (PBS) em proporção de 9:1. Após homogeneização, a mistura foi então analisada em microscópio óptico invertido com objetiva de 20x, adotando as amostras com viabilidade acima de 80%.

#### **2.5. Ensaio de Migração e Invasão Celular por Câmara de Boyden**

Para avaliação do potencial migratório e invasivo das células, foram utilizados insertos transwell BD BioCoat™ com poros de 8 $\mu$ m (BD Biosciences™) em placas de 24 poços. Para o ensaio de invasão celular, os insertos foram recobertos com Geltrex (Gibco, Paisley, UK) como indicado pelo fabricante. Na parte superior do inserto, as células tumorais SKOV-3 foram adicionadas na quantidade de 1x10<sup>5</sup> células e receberam meio padrão, porém sem soro fetal bovino. Já na parte inferior, foi adicionado meio padrão suplementado de 10% de soro fetal bovino, que funcionará como quimioatrativo para as células. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Após o período de incubação, as células foram fixadas em metanol por 10 minutos e aquelas que não migraram, foram retiradas por raspagem. As células que migraram foram coradas com solução de azul de toluidina a 0,1% durante 10 segundos e fotografadas com a objetiva de 20x em microscópio invertido (ZeissAxiovert®, Alemanha). Os experimentos foram realizados em triplicata e quatro campos foram submetidos a contagem celular utilizando o software *Image J*.

#### **2.6. Ensaio de Resistencia a Anoikis**

Em placas de cultura de 12 poços foi feito um revestimento em cada poço com adesivo poliHEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato) (Sigma-Aldrich, Poole, Reino

Unido). Foi adicionado 500 µL de 10 mg/ml de polyHEMA em etanol a 95%, por poço e colocado para secar; após a repetição do processo, os poços foram lavados com PBS.

As células foram semeadas nos poços em  $1.10^5$ , mantendo os grupos experimentais. Após 24h de tratamento, as células foram coletadas de poços revestidos com polyHEMA por pipetagem e centrifugação, seguido de tratamento com tripsina/EDTA para produzir uma única suspensão celular. As células totais nos poços de controle não revestidos foram coletadas usando tripsina/EDTA, novamente para produzir suspensões de célula única. O número de células viáveis foi determinado por exclusão de azul de tripan utilizando o contador automático LunaII. O ensaio foi realizado em triplicata técnica e biológica.

### **2.7. Ensaio de citotoxicidade por MTT**

As células SKOV-3 foram expostas a diferentes concentrações crescentes de melatonina para se determinar o IC50 (2 µm, 3,4 µm, 5 µm e 7 µm) por 24 h e também nas concentrações de  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  M para o luzindole por 24h. As células foram semeadas em placas com 96 poços e a sobrevivência celular foi observada nos períodos de 24 h através de método colorimétrico. Após 24h de tratamento, a solução de MTT (5mg/mL) foi adicionada e a presença dos cristais de formazan avaliada através de leitor de microplaca (Epoch) a 550 nm. Para a curva de referência, foi utilizado o espectro de leitura (650 nm). A percentagem de citotoxicidade foi calculada com base no grupo controle.

### **2.8. Análise e quantificação de E-caderina e da proteína relógio Per-2 por Western Blot**

Após os tratamentos, as células na concentração de  $1,0 \times 10^6$  foram lavadas com PBS e, em sequência, maceradas com a utilização do tampão de lise RIPA contendo inibidores de protease (Sigma CO, Saint Louis, MO, USA). Os tubos foram mantidos em gelo para coleta individual do sobrenadante, e tiveram uma alíquota retirada para quantificação proteica total pelo método de Bradford. Amostras com 40 µg de proteína foram solubilizados e aplicados em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Após a realização da eletroforese, às proteínas foram eletrotransferidas (300 mA) para membrana de nitrocelulose (BioRad, Califórnia, USA). Em seguida, a membrana foi bloqueada com BSA 3% (m/v) e incubada com os anticorpos primários monoclonais: anti-E-caderina (1:500) e anti-Per-2 (1:500) (ABCAM, Cambridge, UK) e diluídos em

BSA 1%, durante a noite. A membrana foi lavada 3X em solução basal (TBS- *Tween* 1% [v/v]) e incubada com anticorpo secundário anti-Mouse (1:10,000) para E-caderina e anti-rabbit (1:10,000) para Per-2, em BSA 1% (m/v), conjugado à peroxidase-HRP (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1 h. Após a lavagem com solução basal 3X, a reação foi revelada pelo sistema de detecção *ECL® Selected Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Após a captura da imagem em transiluminador *G-Box* foi feita a quantificação densitométrica das bandas utilizando o software *Image J*. A intensidade da banda foi quantificada através do índice de densitometria óptica (IOD) relativo à intensidade de GAPDH (marcador celular endógeno).

## 2.9. Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica das células recolhidas ao final do tratamento foi realizada por RT-qPCR, utilizando o sistema Sybr Green™ PCR Master Mix (Applied Biosystems™) no equipamento StepOnePlus™ System (Applied Biosystems™). Resumidamente, as células dos diferentes grupos foram submetidas à extração do RNA total com TRIzol (Life Technologies Corporation® Van Allen Way, Carlsbad, CA, USA). As concentrações de RNA total foram mensuradas mediante NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Scientific™). Em seguida, o RNA extraído foi tratado com DNase (Qiagen®) conforme o protocolo do fabricante para eliminação de possível contaminação com DNA genômico. Posteriormente, a transcrição do mRNA em cDNA foi realizada com o Kit de transcrição reversa High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific) e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante.

O volume final do mix para PCR foi de 20 µL, em duplicada, e as condições para os ciclos foram 95° C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95° C por 15 segundos, seguida de anelamento a 60° C por 1 min (40 ciclos). Os dados brutos dos níveis de fluorescências (dados sem correção da linha de base), obtidos ao final da PCR, foram submetidos ao programa LinRegPCR (Remakers et al., 2003) para correção da linha de base e obtenção dos valores do ciclo de threshold (Ct). A abundância relativa dos genes alvos foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e a média geométrica da expressão dos genes

*PPIA* e *RPS13* foi utilizada como referência para a normalização dos dados (testado pelo software GeNorm), como descrito por PFAFFL (2001).

**Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na análise de RT-qPCR.**

<b>Gene</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referências</b>
<b><i>PPIA</i></b>	F: AGACAAGGTCCCAAAGAC R: ACCACCCTGACACATAAA	NM_021130
<b><i>RPS13</i></b>	F: CGAAAGCATCTTGAGAGGAACA R: TCGAGCCAAACGGTGAATC	NM_001017
<b><i>VIM</i></b>	F: CCTCTCCAAAGGCTGCAGAA R: GACAAGAGCGCCCTAAGTT	NM_003380.5
<b><i>CDH1</i></b>	F: TGGGCCAGGAAATCACATCC R: GGCACCAGTGTCCGGATTAA	NM_004360.5
<b><i>TWIST</i></b>	F:GGATCCATGATGCAGGACGTGTCCA GCTCGCCA R:CTCGAGCTAGTGGGACGCGGACATG GACCAGGC	Yi B R et al., 2014

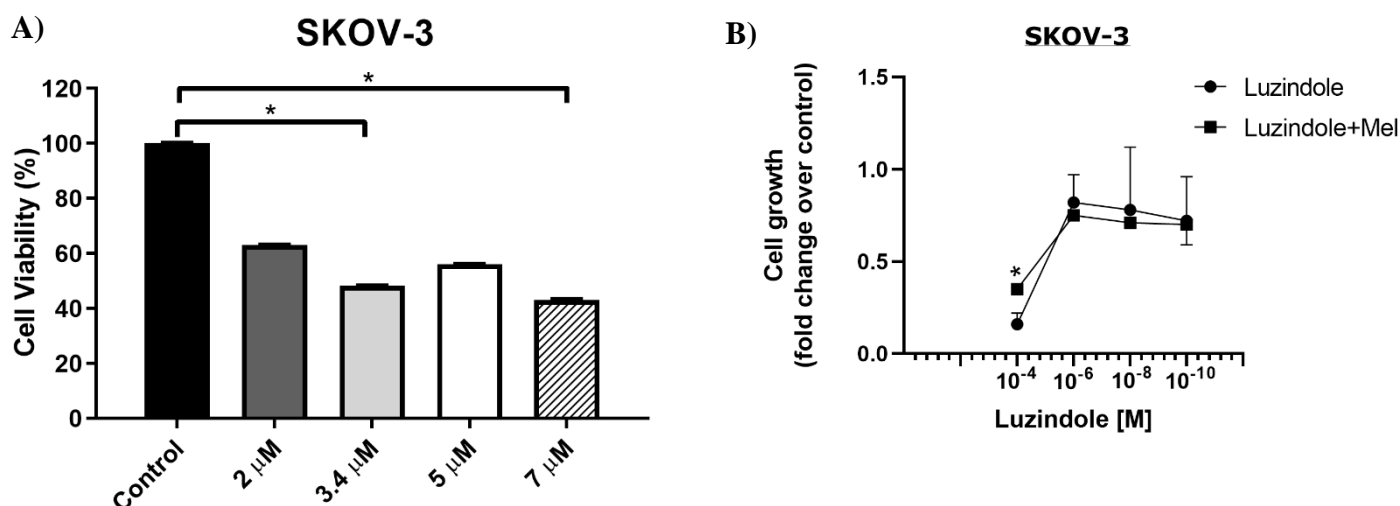
### 2.10. Forma de análise dos resultados

As variáveis foram estudadas através da análise de variância (One-way ANOVA) Os resultados foram expressos em média  $\pm$  SEM e apresentados em gráficos gerados no software GraphPad Prism V.9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), considerando-se o valor crítico de 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Baixa concentração de melatonina promove citotoxicidade em células de carcinoma ovariano

Para a utilização de melatonina e Luzindole nos experimentos, foi realizado inicialmente o ensaio de citotoxicidade (MTT) com diferentes concentrações em células SKOV-3, sendo a concentração mais próxima do IC50 escolhida para os demais testes experimentais. A melatonina foi testada em concentrações próximas a fisiológicas (2  $\mu\text{M}$ , 3,4  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$ ). As concentrações de 3,4  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$  de melatonina reduziram a viabilidade das células SKOV-3, sendo a concentração que mais se aproximou do IC50 foi a de 3,4  $\mu\text{M}$  após 24 h (Figura 1A). Para determinar se o efeito da melatonina é dependente ou não dos receptores MT1 e MT2, utilizamos o luzindole como antagonista dos receptores de melatonina. Assim, para evitar qualquer interferência negativa no ensaio com o fármaco, testamos a sua citotoxicidade, através do ensaio de MTT nas seguintes concentrações:  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  M. A melhor concentração de luzindole após 24h foi a de  $10^{-6}$  M, onde as células se mantiveram com crescimento regular sem influência negativa do fármaco (Figura 1B).

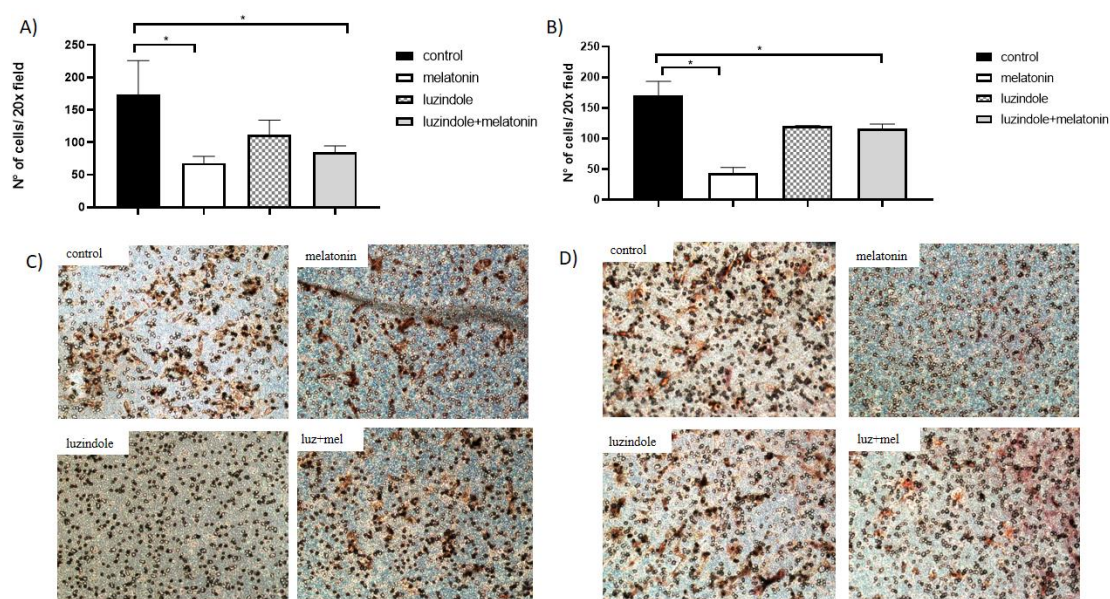


**Figura 1.** Ensaio de citotoxicidade por MTT para melatonina e Luzindole. A) Concentrações de melatonina testadas nas células SKOV-3 após 24 h, onde é possível observar que a concentração que se aproxima de IC50 foi a de 3,4  $\mu\text{M}$ . ANOVA complementado com Tukey. \*  $P < 0,05$ . B) Concentrações de luzindole testado em células SKOV-3 verificadas através do

crescimento celular, onde a concentração de  $10^{-6}$  M possui menor citotoxicidade. Teste t de Student. \*  $P < 0,05$ .

### 3.2. Baixas concentrações de melatonina atenuam o potencial migratório e invasivo de células SKOV-3 independente dos receptores MT1 e MT2

Para mimetizar o potencial migratório e invasivo das células SKOV-3, foi utilizado transwell, em placas de 24 poços onde foram expostas aos tratamentos com melatonina por 24h. Como observado na figura 2A e 2B, o tratamento com melatonina reduziu significativamente o potencial invasivo e migratório das células em relação ao controle, de maneira independente dos receptores. O luzindole isolado não teve diferença significativa quando comparado ao grupo controle, porém a associação de luzindole+melatonina mostrou redução quando comparado ao grupo controle, enfatizando o papel da melatonina como potencial agente atenuador da migração e invasão celular. Por outro lado, o grupo luzindole+melatonina não mostrou diminuição significativa comparado ao grupo melatonina isolado. As figuras 2 C e D mostram as células coradas que sofreram migração e invasão, respectivamente, após os tratamentos.

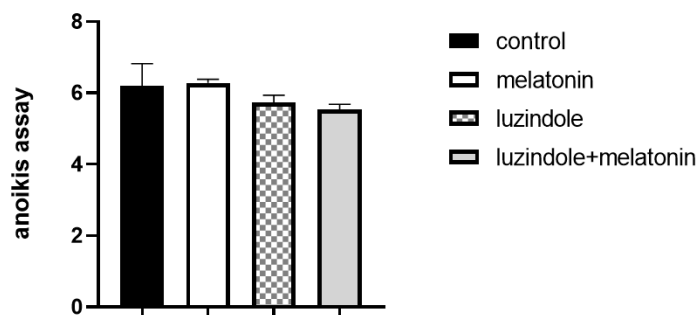


**Figura 2. Ensaio de migração e invasão celular.** A) Ensaio de migração celular após o tratamento com melatonina, luzindole e associação de luzindole e melatonina por 24h. B) Ensaio de invasão celular após o tratamento com melatonina, luzindole e associação de luzindole e melatonina por 24h.. \*  $P < 0.05$ . C) Imagens das células coradas no ensaio de migração, onde podemos observar que as células escuras foram as que conseguiram migrar. D) Imagens das

células coradas no ensaio de invasão, onde podemos observar que as células escuras foram as que conseguiram invadir

### 3.3. A melatonina não altera a resistência a Anoikis das células de CO

Após o tratamento, as células SKOV-3 foram sujeitas ao ensaio de resistência à anoikis, onde elas, após ficarem em suspensão, passaram pelo protocolo de tratamento com melatonina e luzindole. Após 24 h, não foi observado diferença significativa entre os grupos, indicando que as células ainda se mantêm resistentes a anoikis.



**Figura 3.** Gráfico demonstrando os valores do ensaio de resistência a anoikis.  $P = 0.54$ .

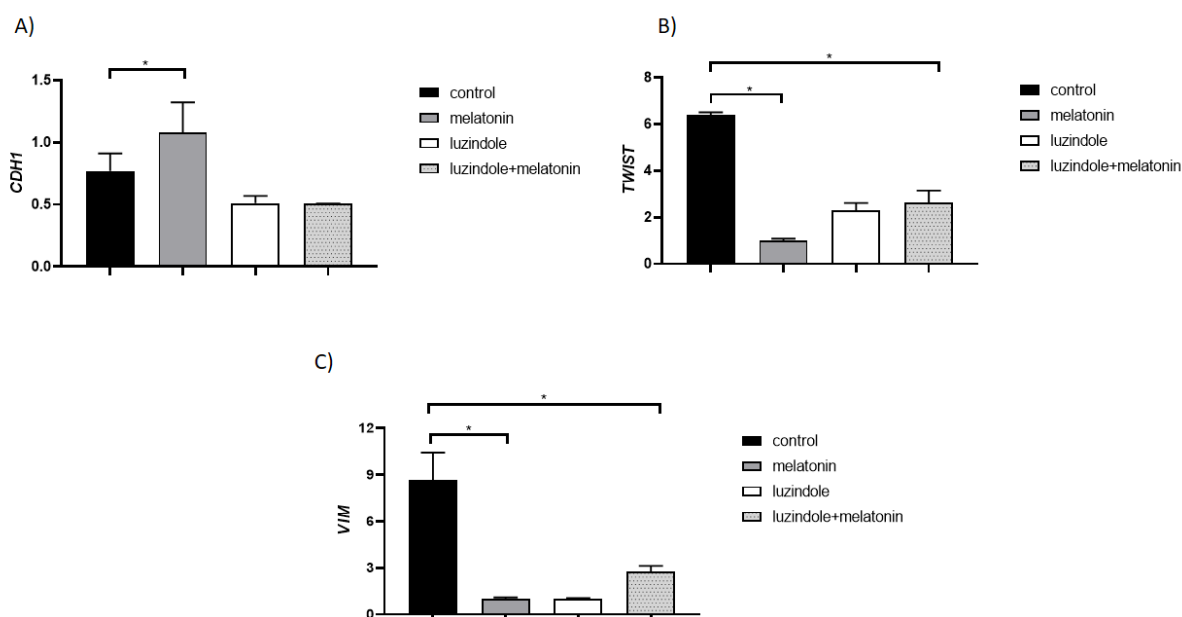
### 3.4. A melatonina regula a expressão dos genes relacionados com TEM

Foi avaliado a expressão dos genes relacionados com o fenótipo epitelial e mesenquimal. O gene *CDHI* apresentou um aumento no grupo tratado com melatonina comparado aos demais grupos (Figura 4A), onde o controle manteve uma baixa expressão semelhante aos grupos tratados com luzindole e luzindole+melaonina, mostrando que a melatonina teve um efeito benéfico, uma vez que a proteína codificada E-caderina está relacionada com a manutenção do fenótipo epitelial das células. A presença do luzindole impediu a atuação da melatonina como tratamento para modificação da expressão de *CDHI*, indicando um efeito dependente do receptor.

A TEM depende de alguns fatores, e o Twist é um fator de transcrição chave nesse processo, se ligando a E-caderina e dando início a transição resultando em migração e invasão celular. A Figura 4 B mostra uma redução drástica do gene *TWIST1* pela melatonina comparado ao grupo controle. O grupo tratado com luzindole+melaonina mostrou redução significativa comparado ao grupo controle, mas não houve diferença em relação ao grupo tratado com melatonina.

O gene que codifica a vimentina (*VIM*) está relacionado com o perfil de células mesenquimais, sendo superexpresso em células tumorais durante o processo de TEM.

Notavelmente, a expressão de *VIM* foi drasticamente reduzida pelo tratamento com melatonina independente da presença ou não do antagonista luzindole (Figura 4 C).

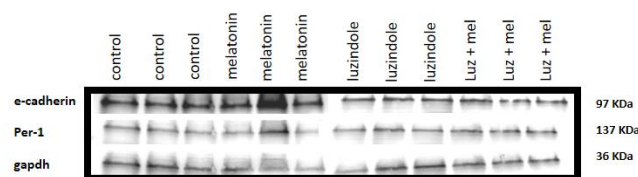


**Figura 4.** Análise da expressão gênica de moléculas envolvidas na transição epitélio-mesênquima. A) Expressão do gene *CDH1*. B) Expressão do gene *TWIST1*. C) Expressão do gene *VIM*. Foi utilizado o *GAPDH* como controle endógeno. \*  $P < 0.05$ . Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica.

### 3.5. A melatonina aumenta os níveis das proteínas E-caderina e Per-2 nas células de CO

Moléculas como as E-caderinas são de extrema importância no processo de TEM, haja visto que são responsáveis por manter fenótipos epiteliais permitindo a união das células epiteliais (Lamouille et al., 2014). Após os tratamentos, o extrato celular foi processado para a análise de western blot. A melatonina aumentou significativamente os níveis de E-caderina em relação ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ; Figura 5 A e B). Os grupos luzindole e associação de luzindole com melatonina não mostraram diferença estatística em comparação ao grupo controle, demonstrando que o aumento de E-caderina mediado pela melatonina é dependente dos receptores de membrana MT1 e MT2. A molécula Per-2 possui um papel muito importante no relógio biológico, e seu aumento está relacionado com a supressão tumoral, uma vez que possui uma relação inversa com o desenvolvimento tumoral (Fu L et al., 2002). Os níveis de Per-2 mostraram efeito biológico com os tratamentos sem, no entanto, apresentar diferença estatística nos

A)



B)



**Figura 5.** Análise de Western Blot para E-caderina e Per-2. A) Perfil representativo de E-caderina e Per-2, utilizando extrato celular de 40 µg de proteína. B) Análise densitométrica das bandas, normalizadas com Gapdh. Os ensaios foram realizados em triplicada biológica e técnica.

#### 4. DISCUSSÃO

O câncer utiliza de vários mecanismos para que sua progressão seja possível, um deles é a transição epitélio-mesênquima, onde as células cancerígenas sofrem uma mudança em seu fenótipo, passando de fenótipo epitelial para mesenquimal.

A melatonina tem sido utilizada em trabalhos como uma possível terapia, modulando os mecanismos envolvidos no processo de progressão tumoral. No nosso trabalho, utilizamos baixas concentrações de melatonina, na presença ou ausência do luzindole, para compreensão do mecanismo de TEM. O receptor de melatonina MT1 é expresso de maneira contínua em células SKOV-3 (Cucielo M S et al.,2022), assim o seu antagonista foi utilizado para verificar a dependência ou não do mesmo para a ação da melatonina nas moléculas de interesse. O ensaio de MTT concluiu que a melhor concentração de Luzindole a ser utilizada nos experimentos foi a de 1 µM, sendo a concentração que promoveu maior viabilidade das células, provando seu papel apenas como antagonista do receptor, sem interferir na viabilidade de SKOV-3

Os resultados evidenciaram resposta citotóxica positiva da melatonina em concentração de 3,4  $\mu$ M, uma faixa considerada próxima da fisiológica. Essa quantidade seria equivalente a concentração plasmática de aproximadamente 600 pg/mL de melatonina. Trabalhos anteriores com a célula SKOV-3 utilizaram a melatonina em concentrações farmacológicas elevadas e evidenciaram redução na sinalização de PI3K-AKT relacionada com a progressão do CO (Gaiotte L et al, 2021). Assim, comprovamos que a melatonina tem efeito citotóxico considerando concentrações mais baixas, quando é avaliada em período de exposição menor. Outros trabalhos utilizam concentrações variadas entre 1mM a 6mM, em outros tipos de tumores, como de bexiga e colón (Akbarzadeh M et al 2016; Gaiotte L et al, 2021; Carpentieri A., et al 2012; Zemła A et al., 2017).

As células demonstraram uma diminuição significativa em seus potenciais migratórios e invasivos mesmo em baixa concentração, uma vez que regula a passagem da célula neoplásica do tecido de origem para o estroma evitando que caia na corrente sanguínea. Gaiotte L et al (2021) encontraram resultados semelhantes aos descritos, entretanto, utilizando uma concentração muito maior de melatonina a 3,2 mM. Esse resultado sugere que mesmo em concentrações baixas, a melatonina possui um potencial terapêutico.

As células SKOV-3 são células tumorais de CO isoladas de ascite, ou seja, células que são encontradas em meio aquoso e suspensas. A resistência a *anoikis* é uma característica de células tumorais (Bretland, A. J., et al., 2000), e a melatonina não promoveu a reversão dessa resistência. Como as células SKOV-3 são encontradas em suspensão e possuem bastante resistência a morte por *anoikis*, mesmo após o tratamento com melatonina, não obtivemos resultado significativo. Vale ressaltar que mecanismos de ancoragem celular foram aumentados, além da atenuação da migração e invasão celular, sugerindo que essas células tumorais encontram dificuldades para se soltarem e migrarem do tecido de origem na presença da melatonina. Características mesenquimais também foram reguladas através de *Vimentina*, assim como o gene *TWIST1*, que em células tumorais tem papel anti-apoptótico. Desta forma, compreendemos que a melatonina não mostrou eficiência relacionada a *anoikis*, porém regulou importantes processos que são anteriores ao desprendimento celular.

Para que o processo de TEM se inicie deve acontecer importantes comportamentos celulares, como o desprendimento das células cancerígenas do tecido de origem (Coghlin, C.& Murray G.I. 2010). Uma molécula importante nesse processo

é a E-caderina, à qual é responsável pela ancoragem celular e manutenção de fenótipo epitelial (Brasch J et al., 2012; De Beco S et al., 2012). As células de CO, quando expostas a uma concentração de 3,4  $\mu$ M de melatonina, tiveram um aumento significativo na expressão gênica de *CDH1* e níveis proteicos de E-caderina; esses efeitos foram dependentes dos receptores MT1 e MT2, pois quando associada ao seu antagonista (luzindole), a melatonina não conseguiu produzir o mesmo efeito nas células. Pode-se observar nos resultados apresentados que a melatonina mesmo em concentração baixa tem capacidade de alterar as moléculas relacionadas com a TEM em células de CO.

Em relação a expressão genica, a melatonina demonstrou um papel importante no aumento no gene *CDH1* (E-caderina). Quando há diminuição de *CDH1* geralmente ocorre o aumento de *Vimentina*, gene com alta expressão em células cancerígenas responsável pela mudança de fenótipo epitelial para mesenquimal facilitando a TEM. A melatonina foi eficaz em diminuir a expressão do gene *VIM* que codifica a *Vimentina*, sugerindo um menor potencial migratório, como já demonstrado em estudos com células de câncer de bexiga (Hsiao S Y et al., 2022).

A expressão elevada de *Twist* em células tumorais está relacionada com a progressão tumoral, uma vez que esse fator promove modificação fenotípica das células epiteliais para mesenquimais (Yang J et al., 2004). Estudos revelaram que a alta expressão de *Twist* pode conferir diminuição da taxa de apoptose de células tumorais (Wai K et al., 2005). Após o tratamento com a melatonina, as células SKOV-3 apresentaram uma redução significativa na expressão do gene *TWIST1*, indicando que a melatonina age de maneira positiva para redução de mecanismos que levam as células à subversão do seu fenótipo; estudos anteriores demonstraram aumento significativo desse gene em células de CO com morfologia mesenquimal, após a indução do aumento da sua expressão usando vetores (Roberts C M et al., 2016).

O gene *PER* possui um papel importante na oncogênese, atuando como um supressor tumoral; quando esse gene está superexpresso, a amplitude diurna é aumentada, acarretando em uma interferência no ciclo celular (Yang X et al., 2009). Embora os resultados não tenham demonstrado uma diferença estatística no aumento da proteína Per-2, pode se observar um efeito biológico relacionado com o aumento desse supressor tumoral, sugerindo que a melatonina tem um papel no aumento de genes supressores no CO, como *PER*. Estudos adicionais envolvendo outros genes-relógio com função de supressor tumoral no CO frente a ação da melatonina serão necessários.

## 5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a melatonina em baixas concentrações possui um efeito citotóxico em células tumorais de CO. A melatonina atua reduzindo processos como invasão e migração celular, sem reverter a resistência a anoikis. A melatonina foi efetiva em aumentar a expressão de moléculas relacionada com a ancoragem celular, enquanto diminui genes relacionados a fenótipos mesenquimais e anti-apoptóticos. Alguns dos efeitos da melatonina são dependentes do receptor MT1 enquanto outros são independentes. Desta forma, a melatonina mostra ser uma ferramenta útil no controle dos processos da TEM no CO, servindo como um aliado potencial na atenuação do processo metastático

## Referências

Akbarzadeh, M.; Nouri, M.; Banekohal, M.V.; Cheraghi, O.; Tajalli, H.; Movassaghpour, A.; Soltani, S.; Cheraghi, H.; Feizy, N.; Montazersaheb, S.; et al. Effects of Combination of Melatonin and Laser Irradiation on Ovarian Cancer Cells and Endothelial Lineage Viability. *Laser Med. Sci.* 2016, 31, 1565–1572.

Bowtell, D.D. et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 668–679 (2015).

Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L (2012). Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesions. *Trends Cell Biol*, 22, 299-310.

Carpentieri, A.; Diaz de Barboza, G.; Areco, V.; Peralta López, M.; Tolosa de Talamoni, N. New Perspectives in Melatonin Uses. *Pharmacol. Res.* 2012, 65, 437–444.

cells. *Journal of Pineal Research*, v. 28, no. 4, p. 193–202, May 2000.

Chuffa, L.G.d.A.; Lupi-Junior, L.A.; Costa, AB.; Amorim, J.P.d.A.; Seiva, F.R.F. The Role of Sex Hormones and Steroid Receptors on Female Reproductive Cancers. *Steroids* 2017, 118, 93–108.

Clarke-Pearson DL. *N Engl J Med.* 2009;361(2):170-7. doi: 10.1056/NEJMcp0901926.

Committee on Gynecologic Practice, Matteson KA, Gunderson C, Richardson DL. The Role of the Obstetrician-Gynecologist in the. *Obstet Gynecol.* 2017;130:e146-9.

CONTI, A. et al. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow  
Cucielo MS, Cesário RC, Silveira HS, Gaiotte LB, dos Santos SAA, de Campos Zuccari DAP, Seiva FRF, Reiter RJ, de Almeida Chuffa LG. A melatonina reverte o metabolismo do tipo Warburg e reduz o potencial da membrana mitocondrial das células de câncer de ovário independente da ativação do receptor MT1. *Moléculas* . 2022; 27(14):4350. <https://doi.org/10.3390/molecules27144350>

DE ALMEIDA CHUFFA, Luiz Gustavo et al. Clock genes and the role of melatonin in cancer cells: an overview. *Melatonin Research*, v. 2, no. 2, p. 133-157, 2019.

De Beco S, Amblard F, Coscoy S (2012). New insights into the regulation of E-cadherin distribution by endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 95, 63-108.

Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P and Lee C: The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*. 111:41–50. 2002.

Gaiotte, L.B.; Cesario, R.C.; Silveira, H.S.; Oliveira, D.A.D.M.; Cucielo, M.S.; Gorete, G.; Kaneno, R.; Aparecida, D.; Campos, P.D.; Russel, J. Combination of Melatonin with Paclitaxel Reduces the TLR4-Mediated Inflammatory Pathway, PD-L1 Levels, and Survival of Ovarian Carcinoma Cells. *Melatonin Res.* 2022, 5, 34–51.

Greening, D.W. et al. Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 60–71 (2015).

Hsiao, S.-Y.; Tang, C.-H.; Chen, P.-C.; Lin, T.-H.; Chao, C.-C. Melatonin inhibits EMT in bladder cancer by targeting autophagy. *Molecules* 2022, 27, 8649.

Initiation, Progression and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*,

Kostoglou-Athanassiou I. Therapeutic applications of melatonin.

LAMOUILLE, Samy; XU, Jian; DERYNCK, Rick. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 15, no. 3, p. 178-196, 2014.

Loret N., Denys H., Tummers P., Berx G. The Role of Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Resistance to Therapy. *Cancers*. 2019; 11:838. doi: 10.3390/cancers11060838

REITER, Russell J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of pineal research*, v. 61, no. 3, p. 253-278, 2016.

REITER, Russell J.; SHARMA, Ramaswamy; MA, Qiang. Switching diseased cells from cytosolic aerobic glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation: A melatonin-regulated metabolic rhythm?. *Journal of pineal research*, v. 70, no. 1, pg. e12677, 2021.

Roberts CM, Tran MA, Pitruzzello MC, Wen W, Loeza J, Dellinger TH, Mor G, Glackin CA. TWIST1 drives cisplatin resistance and cell survival in an ovarian cancer model, via upregulation of GAS6, L1CAM, and Akt signaling. *Sci Rep*. 2016 Nov 23;6:37652.

Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE (2001) Polyunsaturated fatty acids, melatonin, and cancer prevention. *Biochem. Pharmacol*.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2018*. *CA Cancer J Clin*.

Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. *Cancer Statistics*. *CA A Cancer J. Clin*. 2022, 72, 7–33

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA A Cancer J. Clin*. 2021, 71, 209–249

Tan, D.-X.; Manchester, L.; Qin, L.; Reiter, R. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. *Int. J. Mol. Sci*. 2016, 17, 2124

Torre AL, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. *CA Cancer J Clin*. 2018;

Usman S., Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S., Jamal A., Teh M.-T., Waseem A. Vimentin is at the center of epithelial mesenchymal transition (EMT)-mediated metastasis. *Cancers*. 2021

Vergara, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 291, 59–66 (2010).

Weidle, U.H., Birzele, F., Kollmorgen, G. & Rueger, R. Mechanisms and targets involved in dissemination of ovarian cancer. *Cancer Genomics Proteom.* 13, 407–423 (2016).

Xiaomeng Zhang, Chee Wai Chua, Kwok W. Chan, Franky L. Chan, Carlotta Glackin, Yong-Chuan Wong, Xianghong Wang; Up-Regulation of TWIST in Prostate Cancer and Its Implication as a Therapeutic Target. *Cancer Res* 15 June 2005; 65(12): 5153–5162.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Célula* 2004;117:927–39.34.

Yang X, Wood PA, Oh EY, Du-Quiton J, Ansell CM and Hrushesky WJ: Down regulation of circadian clock gene Period 2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm. *Breast Cancer Res Treat.* 117:423–431. 2009.

Zare, H.; Shafabakhsh, R.; Reiter, R.; Asemi, Z. Melatonin Is a Potential Inhibitor of Ovarian Cancer: Molecular Aspects. *J. Ovarian Res.* 2019, 12, 26

Zemła, A.; Grzegorek, I.; Dzięgiel, P.; Jabłońska, K. Melatonin Synergizes the Chemotherapeutic Effect of Cisplatin in Ovarian Cancer Cells Independently of MT1 Melatonin Receptors. *In Vivo* 2017, 31, 801–809.

Zhang X, Wang J, Liu N, Wu W, Li H, Chen J, Guo X. Molecular mechanism of CD163+ tumor-associated macrophage (TAM)-derived exosome-induced cisplatin resistance in ovarian cancer ascites. *Ann Transl Med* 2022;10(18):1014. doi: 10.21037/atm-22-4267.