

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/07/2022.

Efeitos da melatonina nas células de carcinoma ovariano SKOV-3: análise do perfil proteômico global

Roberta Carvalho Cesário

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

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da melatonina nas células de carcinoma ovariano SKOV-3:
análise do perfil proteômico global

ROBERTA CARVALHO CESÁRIO

PROF. DR. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA

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

2022

C421e Cesário, Roberta Carvalho
Efeitos da melatonina nas células de carcinoma ovariano SKOV-3:
análise do perfil proteômico global / Roberta Carvalho Cesário. --
Botucatu, 2022
68 f. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

1. Câncer de Ovário. 2. Melatonina. 3. Proteoma. 4. Mitocondria. 5.
Células SKOV-3. 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 as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Edna e Roberto, minha irmã Natália e meus sobrinhos Mariana e Victor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa não só pela orientação durante todo esse processo, mas também por ter acreditado em mim, ter me aceito como orientada e por todos os ensinamentos científicos e teóricos.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa Maira e Henrique, pelo apoio, pela amizade, por todas as conversas e ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Em especial a minha amiga Letícia Gaiotte que esteve comigo em cada momento dentro e fora da vida acadêmica e se tornou minha família em Botucatu.

A minha família, em especial a minha mãe Edna que sempre se sacrificou para tornar meus sonhos possíveis, sem seu apoio jamais teria chego até aqui. Ao meu pai Roberto, meus sobrinhos e minha irmã Natália que torceram por mim e me apoiaram em todas as decisões. A Maria Beatriz pelo companheirismo e por estar sempre ao meu lado em tudo.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) cujo auxílio financeiro foi essencial para manutenção dessa pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
CAPÍTULO 1.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Câncer de ovário: fatores de risco e variedades.....	15
1.2 Melatonina e o CO.....	18
1.3 Melatonina e CO: envolvimento com a análise proteômica.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. HIPÓTESE.....	24
4. OBJETIVO GERAL.....	25
4.1 Objetivos específicos.....	25
5. REFERENCIAS.....	26
CAPÍTULO 2.....	30
Artigo.....	31
Supplementary material.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CO: câncer de ovário

ROS: espécies reativas de oxigênio

RNS: espécies reativas de nitrogênio

PDH: complexo piruvato desidrogenase

PDK: piruvato desidrogenase quinase

AANAT: Serotonin N-acetyltransferase

iTRAQ: isobaric tag for relative and absolute quantitation

DMBA: dimethylbenz(a)anthracene

HIF-1: fator induzível por hipóxia

MDR1: resistência a múltiplas drogas

ACETIL-COA: Acetilcoenzima A

ACTB: beta-actina

PD-1: proteína de morte celular programada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação do CO quanto a origem, subtipos histológicos e grau de malignidade do tumor.

Figura 2: Linhagem SKOV-3.

Figura 3: Efeitos da melatonina no metabolismo mitocondrial em células normais e tumorais.

Figura 4: Resumo dos efeitos inibitórios da melatonina em mecanismos moleculares envolvidos na progressão do CO.

Resumo

O câncer de ovário (CO) é a segunda malignidade mais letal do sistema genital feminino e apresenta uma expectativa de sobrevida menor que 50% após o quinto ano do diagnóstico. Dependendo do subtipo, o CO está associado com maior risco de desenvolvimento de quimioresistência e prognóstico ruim. A melatonina (Mel) é um neurohormônio secretado pela glândula pineal na fase de escuro e tem mostrado propriedades antitumorais em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da terapia com melatonina, em diferentes doses, sobre o proteoma das células de carcinoma ovariano humano (linhagem SKOV-3). O estudo foi composto pelos seguintes grupos experimentais; 1) Grupo Controle: células SKOV-3 tratadas com veículo; 2) Grupo Mel 0.8 mM: células SKOV-3 tratadas com melatonina na concentração de 0.8 mM por 48h; 3) Grupo Mel 1.6 mM: células SKOV-3 tratadas com melatonina na concentração de 1.6 mM por 48h; 4) Grupo Mel 2.4 mM: células SKOV-3 tratadas com melatonina na concentração de 2.4 mM por 48h. Após 48h de tratamento com melatonina, foi realizada a extração e a quantificação das proteínas. O perfil proteômico foi analisado e identificou-se 636 proteínas totais no grupo controle. A partir desses dados, foram selecionadas proteínas diferencialmente reguladas para cada grupo, comparando as expressões das proteínas do grupo controle usando $p < 0,05$ e *fold change* de +1.5 ou -1.5 para determinar as proteínas que foram reguladas de maneira positiva e negativa, respectivamente. Proteínas relacionadas com o sistema imune e o metabolismo do ácido tricarboxílico foram reguladas positivamente nos três grupos expostos a melatonina. Especificamente, a dose de 2.4 mM promoveu alterações importantes, regulando genes envolvidos na síntese de proteínas. Também identificamos 28 genes potenciais compartilhados entre o tecido normal e o tecido tumoral ovariano considerando todos os grupos experimentais, onde a melatonina mostrou alterações na predição de genes codificadores de proteínas ribossomais. Concluímos que a melatonina modula o proteoma das células SKOV-3, principalmente regulando proteínas envolvidas com o sistema imune e metabolismo mitocondrial. Além disso, o tratamento com a dose de 2.4 mM de melatonina promoveu maiores alterações na rede proteica, revelando uma estratégia terapêutica eficaz no combate ao CO.

Palavras-chave: Câncer de Ovário, melatonina, proteoma, mitocôndria, células SKOV-3.

Abstract

Ovarian cancer (OC) is the second most lethal malignancy of the female genital system and has a survival expectation of less than 50% after the fifth year diagnosis. Depending on the subtype, OC is associated with an increased risk of chemoresistance and poor prognosis. Melatonin (5-methoxytryptamine) is a neurohormone secreted by the pineal gland in the dark phase and has shown antitumor properties in both in vitro and in vivo assays. The present study aimed to evaluate the influence of melatonin therapy, at different doses, on the proteome of human ovarian carcinoma cells (SKOV-3 cell line). The study consisted of the following experimental groups; 1) Control Group: SKOV-3 cells treated with vehicle; 2) 0.8 mM Mel Group: SKOV-3 cells treated with melatonin at a concentration of 0.8 mM for 48h; 3) Mel 1.6 mM Group: SKOV-3 cells treated with melatonin at a concentration of 1.6 mM for 48h; 4) Mel 2.4 mM group: SKOV-3 cells treated with melatonin at a concentration of 2.4 mM for 48h. After 48 h of treatment with melatonin, protein extraction and quantification were performed in these cells. The proteomic profile was analyzed, and a total of 636 proteins were identified in the control group. From these data, differentially regulated proteins were selected for each group, comparing the level of the proteins in the control group using $p < 0.05$ and fold change of +1.5 or -1.5 to determine which proteins were positively and negatively regulated, respectively. Proteins related to the immune system and tricarboxylic acid metabolism were upregulated in the three groups exposed to melatonin. More specifically, the dose of 2.4 mM promoted significant changes, thereby regulating molecules involved in protein synthesis. We also identified 28 potential genes shared between normal tissue and ovarian tumor tissue considering all experimental groups, where melatonin showed alterations in predicting genes encoding ribosomal proteins. We conclude that melatonin modulates the proteome of SKOV-3 cells, mainly via regulating proteins involved with the immune system and mitochondrial metabolism. Furthermore, treatment with a dose of 2.4 mM of melatonin promoted more significant alterations in the protein network, thus revealing an effective therapeutic strategy against OC.

Keywords: Ovarian cancer, melatonin, proteome, immune system, mitochondria, SKOV-3 cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Ovário: fatores de risco e variedades

O número de novos casos de câncer no mundo pode crescer cerca de 70% até 2030 e essa estimativa também inclui altas taxas de mortalidade devido ao câncer de ovário (CO), sendo a segunda neoplasia ginecológica que mais causa morte e o oitavo mais incidente entre as mulheres (WHO, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as pacientes diagnosticadas com CO apresentam uma expectativa de sobrevivência após o quinto ano menor que 50%. Isso está relacionado ao fato dos sintomas como: inchaço, saciedade precoce, dor e desconforto pélvico não serem específicos e, desse modo, são constantemente desprezados ou mesmo relacionados com outras doenças (BRETT; PERMUTH; THOMAS., 2017).

Os principais fatores de risco para o CO estão relacionados com idade precoce da menarca, menopausa tardia, números de gestações, tratamento com reposição hormonal e fatores genéticos. Já outros fatores, tais como a dieta, tabagismo, obesidade e consumo de álcool apresentam resultados menos significativos no desenvolvimento da doença, como apontado por Brett *et al.* (2017) e La Vecchia (2017).

O carcinoma ovariano primário pode ser classificado de acordo com a origem, podendo ser epitelial, mesenquimal, de célula germinativa ou da camada da granulosa. Cerca de 90% dos subtipos de CO originam-se a partir da superfície epitelial que recobre o órgão ou de derivações do epitélio *mulleriano* (CHUFFA *et al.*, 2017). O CO epitelial engloba todos os subtipos histológicos e, nesse sentido, são subclassificadas em serosos, mucinosos, endometrióide e célula clara (COOK; VANDERHYDEN, 2019).

Os tumores podem ser reconhecidos com base no seu crescimento e característica molecular, diferenciados em tipo I e tipo II. O tipo I inclui os serosos, de células claras, mucinosos e os tumores de Brenner, considerados de baixo grau, pois apresentam progressão gradual de forma comumente encontrada em outros cânceres epiteliais, apresentando um melhor prognóstico. Já o tipo II, que abrange os serosos de alto grau, desenvolvem um comportamento mais agressivo e de rápida disseminação, sendo o subtipo com pior prognóstico e, conseqüentemente, é causador de 70 a 80% das mortes por CO (Figura 1) (LISIO *et al.*, 2019)

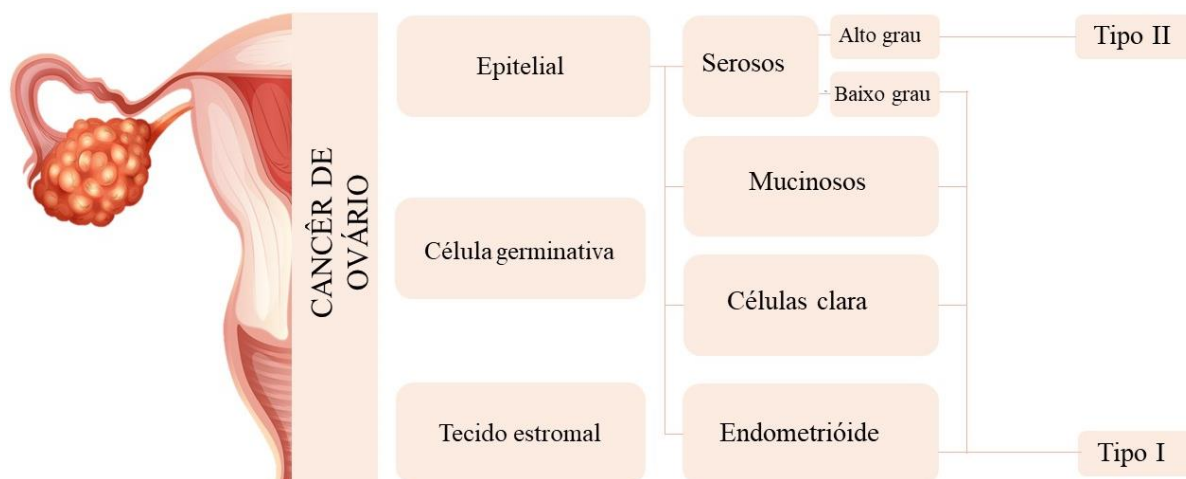


Figura 1: Classificação do CO quanto a origem, subtipos histológicos e grau de malignidade do tumor. Fonte: autor

Mais de 70% dos casos de CO são diagnosticados nos estágios avançados da doença (III ou IV). Por se tratar de um tumor sólido, diferentemente da maioria dos tumores, o CO apresenta metástase hematogênica rara (LENGYEL, 2010). O passo inicial para tal evento é a migração de células malignas para a cavidade peritoneal através da ação de proteases (ÖHLUND *et al.*, 2013; SAWADA *et al.*, 2008; SYMOWICZ *et al.*, 2007).

As opções de tratamento de primeira linha inclui citoredução com associação a quimioterapia (JESSMON *et al.*, 2017), e a base da quimioterapia convencional constitui-se da combinação de derivados de platina e /ou taxol (HSIEH *et al.*, 2019). O diagnóstico tardio e a quimioresistência aos tratamentos convencionais tornam-se fatores limitantes ao tratamento, sendo frequente a recorrência da doença com maior agressividade (CHUFFA *et al.*, 2017). O câncer epitelial ovariano é considerado um tumor quimioresponsivo à terapia padrão com platina e/ou taxol, com aproximadamente 80% da taxa de resposta para o tipo seroso e endometrióide, e apenas 35% para o tipo mucinoso e de células claras (CLOVEN *et al.*, 2004; HO *et al.*, 2004). Porém, mesmo com a cirurgia e a quimioterapia, 70% dos pacientes apresentam recidivas nos três anos seguintes do tratamento (LEDERMANN *et al.*, 2013). A razão pela qual os tratamentos contra o CO apresentam recidivas ou baixa taxa de sucesso está relacionada com quimioresistência que essas células desenvolvem durante o processo de progressão tumoral (KIM *et al.*, 2018). A heterogeneidade tumoral do CO é um obstáculo para a escolha do tratamento e, além disso, a variedade dos tipos de tumor pode ser um dos fatores responsáveis pela quimioresistência adquirida em muitos casos (ROJAS *et al.*, 2016). Essa barreira influencia na sobrevivência de pacientes diagnosticados em estágio avançado de CO,

de modo que, em 90% dos casos, a quimioresistência leva a falhas nos tratamentos e ao aumento da mortalidade (LONGLEY; JOHNSTON, 2005). Os mecanismos de resistência utilizados pelas células tumorais são diversos, incluindo a capacidade celular de causar o efluxo de drogas, que está associado à superexpressão do gene MDR1, o qual codifica o transportador de membrana chamado glicoproteína-P (P-gp), diminuindo a concentração intracelular de medicamentos, como o paclitaxel (CORNELISON; LIANEZA; LANDEN, 2017). Outros fatores são correlacionados a quimioresistência adquirida pelas células de CO após a recorrência da doença, tal como a modificação de genes vinculados ao reparo de proteínas em vias de sobrevivência, ao mesmo tempo que reduzem a expressão de genes supressores tumorais (BRASSEUR; GÉVRY; ASSELIN, 2017). Nesse sentido, a linhagem de carcinoma ovariano SKOV-3 tem sido utilizada em diversos estudos, pois é resistente a diversos agentes quimioterápicos como a cisplatina e adriamicina (Figura 2). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos celulares que levam a quimioresistência trará novas perspectivas que sejam mais eficazes no tratamento das pacientes.

ATCC Number: **HTB-77™**
Designation: **SK-OV-3 [SKOV-3]**

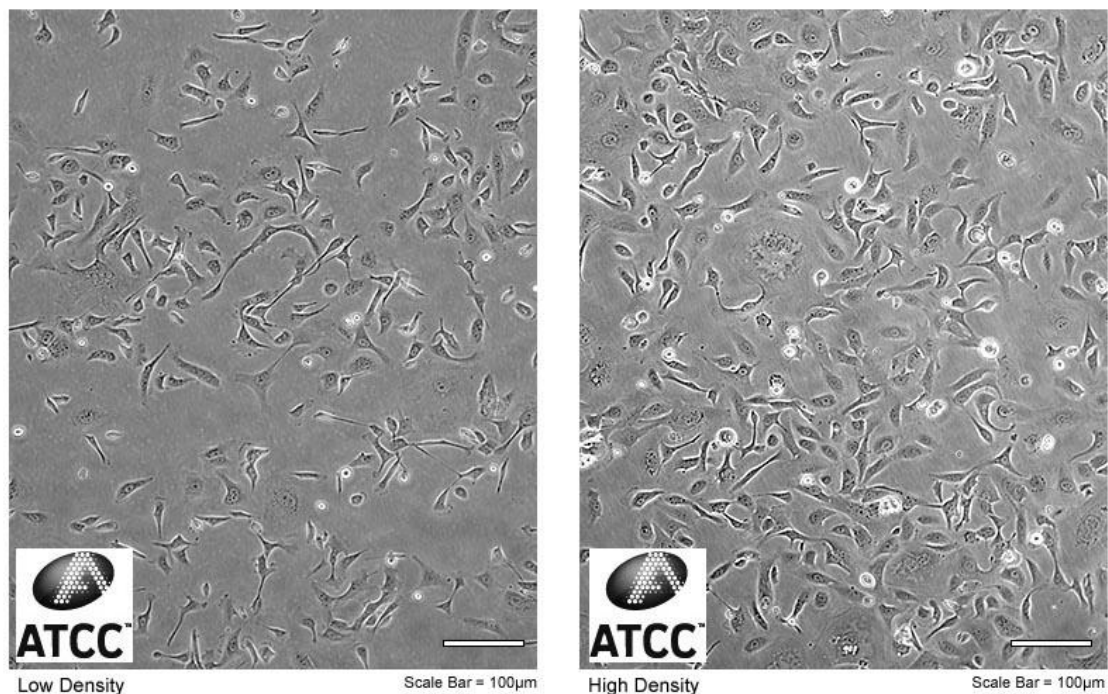


Figura 2: Linhagem SKOV-3. Fonte: ATCC.

1.2 Melatonina e o CO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), é uma pequena indolamina lipofílica secretada pela glândula pineal e em menor quantidade por outros tecidos, sendo principalmente responsável pela regulação do sono (GANDHI *et al.*, 2015; TOSCHES *et al.*, 2014). A melatonina apresenta função bem conhecida na célula normal atuando como um potente antioxidante, removendo espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) do organismo e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes (HU *et al.*, 2016); além disso, a melatonina previne indução de apoptose em células normais (REITER *et al.*, 2016). Entretanto, nas células tumorais, a melatonina tem sido descrita com propriedades antiproliferativas, anti-angiogênica, pró-apoptótica e imunomoduladora (CHUFFA *et al.* 2015; ZONTA *et al.* 2017). Um estudo que reuniu diversos trabalhos apresentou características da melatonina em tipos variados de câncer, como o de próstata, mama e ovário. Esse mesmo estudo indicou a melatonina como um adjuvante nas terapias, diminuindo os efeitos negativos dos tratamentos e aumentando a sensibilidade às drogas quimioterápicas (LI *et al.*, 2017). Os mecanismos moleculares envolvidos com essas propriedades estão relacionados com a síntese de estrogênio, que é regulada pela melatonina via modulação da expressão de receptores e estrogênio, além de atuar na indução de apoptose, e contra a proliferação celular e angiogênese (MENÉNDEZ-MENÉNDEZ; MARTÍNEZ-CAMPA, 2018).

A melatonina foi utilizada também como terapia neoadjuvante na linhagem tumoral cervical HeLa, e mostrou aumento na sensibilidade ao tratamento com cisplatina devido ao acúmulo de dano ao DNA e, conseqüentemente, aumento na taxa de apoptose (PARIENTE *et al.*, 2016). A resistência aos tratamentos convencionais é um grande desafio no tratamento do câncer, particularmente nos carcinomas ovarianos. Em ovários normais, a melatonina é secretada pelas células da granulosa do folículo pré-ovulatório e o tratamento adicional com melatonina pode influenciar na produção de hormônios essenciais na ovulação, qualidade oocitária e atividade antioxidante (TAMURA *et al.*, 2009). A melatonina promove a remoção de radicais livres e atividade de enzimas antioxidantes no ovário. Interessantemente, na tentativa de explicar a origem primária do CO, estudos revelaram que a geração de ROS, durante o processo ovulatório, pode transformar as células das fímbrias da tuba uterina através de alterações e perda da proteína p53; neste contexto, a melatonina pode interromper o efeito tumorigênico induzido por ROS e proteger o tecido original (HUANG *et al.*, 2015).

Reiter e colaboradores (2019) compilaram dados sobre o efeito oncostático da melatonina no câncer; nesse estudo foi mostrado que a melatonina está presente em maiores concentrações nas mitocôndrias de células normais comparadas as células tumorais e o tratamento com a melatonina teve um impacto na reversão do efeito Warburg, diminuindo a proliferação celular, invasão, migração e, conseqüentemente, a metástase tumoral. Células tumorais apresentam um diferencial em suas características metabólicas na via glicolítica, tendo como prioridade a oxidação da glicose e produção de lactato mesmo na presença de oxigênio; porém, essa característica é alterada a noite, onde a taxa de melatonina endógena se torna elevada, de modo que a célula volta a utilizar a fosforilação oxidativa para obter energia. Desse modo, um estudo observou que a melatonina atua revertendo o efeito inibitório da piruvato desidrogenase quinase (PDK) sobre o complexo piruvato desidrogenase (PDH), fazendo com que o piruvato, advindo da glicólise, seja oxidado e passe pelo ciclo de Krebs, chegando à fosforilação oxidativa, ao invés de ser metabolizado em lactato. Assim, o piruvato será metabolizado em acetil-CoA que também possui um papel importante na síntese de melatonina mitocondrial estimulando a enzima AANAT, limitante para síntese de melatonina (Figura 3) (REITER *et al.*; 2020).

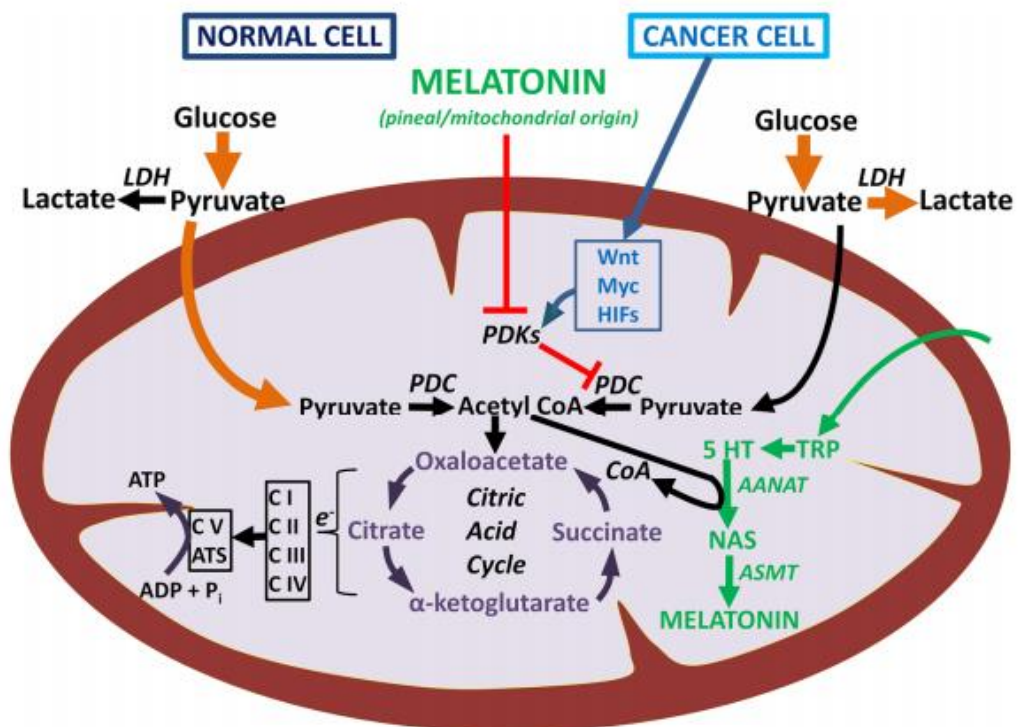


Figura 3: Efeitos da melatonina no metabolismo mitocondrial em células normais e tumorais. Fonte: adaptado de Reiter et al., 2020.

Adicionalmente, outro estudo confirmou que o tratamento com melatonina, nas concentrações de 400 a 600 μM , reduziu a taxa de sobrevivência e proliferação das linhagens de células tumorais ovarianas OVCAR-429 e PA-1, aumentando o número de células na fase G1 do ciclo celular e diminuindo o número de células na fase S do ciclo celular (SHEN *et al.*, 2016).

Em células tumorais SKOV-3, a melatonina tem apresentado efeitos inibitórios na sobrevivência celular, além de potencializar o tratamento em combinação com a cisplatina (ZEMLA, *et al.*, 2017). Estudos *in vivo* reportaram os efeitos da terapia com melatonina a longo prazo estimulando as proteínas pro-apoptóticas (p53, BAX, caspase-3 total e clivada) e inibindo as proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e survivina) em modelos animais de CO papilífero seroso. Interessantemente, a melatonina promoveu aumento na expressão de p53, BAX e caspase-3 ativa, além de induzir a fragmentação do DNA observada pelo teste do TUNEL (CHUFFA, *et al.*, 2016a). O uso da melatonina no tratamento de CO tem demonstrado resultados promissores em estudos *in vitro* e *in vivo*, com um papel importante na apoptose das células tumorais e, em contrapartida, favorecendo a sobrevivência de células normais (Figura 4) (CHUFFA; REITER; LUPI, 2017).

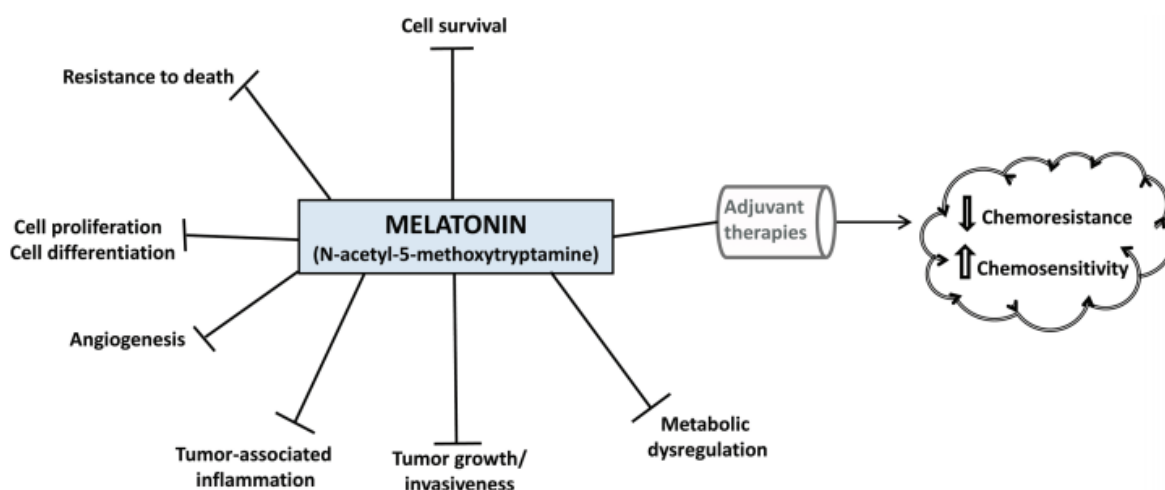


Figura 4: Resumo dos efeitos inibitórios da melatonina em mecanismos moleculares envolvidos na progressão do CO. Fonte: Chuffa *et al.*, 2017.

Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa já documentou a interação da melatonina com o metabolismo energético do CO em modelo experimental *in vivo* envolvendo a utilização da estratégia proteômica global. Embora nenhuma mudança histopatológica tenha sido evidenciada, a melatonina diminuiu a expressão de proteínas envolvidas em diversos processos

metabólicos, como na geração de metabólitos e energia celular, vias associadas ao estresse do retículo endoplasmático, proteínas de processamento e apresentação de antígeno, e ainda proteoglicanos relacionados ao CO. Outras proteínas importantes relacionadas aos processos mitocondriais (ex: desidrogenases) e enzimas associadas ao metabolismo energético também tiveram baixa expressão após o tratamento com melatonina. Essas alterações metabólicas podem afetar a glicólise aeróbica (efeito Warburg) resultando na diminuição da proliferação e potencial metastático das células tumorais (CHUFFA *et al.*, 2016b). Tendo a propósito que a melatonina regula muitas funções mitocondriais, existe a necessidade de se compreender qual tipo de relação é estabelecida na célula do CO humano e quais são as alterações moleculares apresentadas frente aos tratamentos com melatonina.

1.3 Melatonina e CO: envolvimento com a análise proteômica

Embora nos últimos anos ocorreram avanços nos métodos para diagnóstico de diversos tipos de câncer, o CO continua contabilizando altos índices de mortalidade devido à ausência de diagnóstico precoce (STENZEL; ABRAMS; MOYSICH, 2019). Nesse sentido, estudos estão sendo realizados para identificar formas de melhorar o prognóstico e, consequentemente, aumentar a expectativa de sobrevivência dos pacientes. Dessa forma, a análise proteômica se tornou uma alternativa promissora no estudo de alterações moleculares nas células tumorais (TOSS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2017;). Essa técnica gera informações que facilitam a identificação de alterações metabólicas e possíveis biomarcadores em células tumorais, importantes no aperfeiçoamento de prognósticos e no desenvolvimento de novas terapias (NALI *et al.*, 2018).

Recentemente, um perfil proteômico por espectrometria de massa em tecidos normais e tumorais de células de câncer ovariano, identificou 212 proteínas, das quais 6 foram observadas alteradas mostrando um papel importante na proliferação de células tumorais. A transgelin, queratina 14, ACTB, apoliproteína A1, peroxirredoxina-2 e a haptoglobina funcionam como ligantes em uma rede de sinalização que inclui resistência apoptótica, inflamação e motilidade celular, concluindo que mudanças na expressão dos genes dessas proteínas podem ser considerados biomarcadores para o diagnóstico dessa doença (ZADEH *et al.*, 2019).

Um estudo que utilizou células da linhagem SKOV-3 de câncer de ovário investigou mudanças proteicas em vias metabólicas mitocondriais. Após a análise, foi possível determinar proteínas modificadas em algumas vias importantes na progressão tumoral. Uma dessas vias, a

resistência a apoptose, é conhecida como um fator marcante em células tumorais e, nesse trabalho, foi observada uma disfunção na apresentação de antígenos relacionados aos receptores PD-1, importantes na morte celular programada. Alterações na via de sinalização GP6, relacionada a síntese plaquetária, no fator de tradução EIF2 e na função da glutatona sintase responsável por controlar a geração de ROS também foram identificadas nessas células tumorais (LI; ZHAN, 2019).

Fan e colaboradores (2015) utilizaram iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) para uma análise proteômica quantitativa, e observaram mudanças na expressão de proteínas entre 10 linhagens celulares de carcinoma ovariano e 2 linhagens celulares epiteliais normais. Alterações proteicas entre as linhagens foram identificadas e, desse modo, a comparação da expressão de proteínas entre as células de carcinoma e células normais demonstraram a importância da análise proteômica para a identificação de alvos moleculares que possam auxiliar no diagnóstico e tratamento da doença, apresentando melhor estratégia quando comparada apenas às mutações genômicas ou a transcrição de genes.

Nos últimos anos, os mecanismos moleculares da melatonina tem sido estudados em diversos tipos de câncer, incluindo o de ovário, apresentando efeitos pro-apoptóticos e parada do ciclo em células tumorais, sendo destacada como uma terapia adjuvante aos quimioterápicos já utilizados, melhorando sua eficácia e diminuindo os efeitos adversos (LI *et al.*, 2017). Nosso grupo de pesquisa analisou a perfil proteômico quantitativo em um modelo in vivo de câncer de ovário induzido com DMBA e, posteriormente, tratados com a melatonina. Dentre as proteínas reguladas negativamente por esse hormônio, estavam as pertencentes a diversas vias metabólicas que são essenciais para a sobrevivência da célula, como: sinalização via HIF-1, geração de energia, processamento e apresentação de antígenos e proteoglicanos relacionados aos câncer, apontando ação efetiva da melatonina na atenuação da proliferação celular e do metabolismo (CHUFFA *et al.*, 2016b). Para avaliar efetivamente a ação da melatonina na célula tumoral estudos adicionais são necessários para elucidar o metabolismo molecular da célula de carcinoma ovariano exposta a diferentes concentrações de melatonina e, então, traçar redes de eventos moleculares que possam auxiliar na compreensão dos seus efeitos terapêuticos.

2. JUSTIFICATIVA

Mecanismos moleculares envolvidos na proliferação, diferenciação celular, apoptose e resistência aos tratamentos estão associados com a progressão do CO, e já são conhecidos os efeitos benéficos da terapia funcional com a melatonina sobre essas vias de regulação no CO (CHUFFA *et al.*, 2018). O presente estudo investigará quais moléculas potenciais estão diferencialmente expressas nas células SKOV-3 frente ao tratamento com diferentes doses de melatonina. Sabendo que a melatonina é uma molécula que pode atuar por vários mecanismos, a compreensão desses efeitos poderá trazer novas oportunidades para o tratamento do CO.

3.HIPÓTESE

Considerando a importância do tratamento com melatonina nas células tumorais, a hipótese do estudo é de que o tratamento com melatonina altera a biossíntese de proteínas que estão relacionadas com o prognóstico ruim do CO, estimulando positivamente a apoptose e modificando o metabolismo das células SKOV-3.

4. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da terapia com melatonina sobre as células de carcinoma ovariano humano (linhagem SKOV-3), utilizando a estratégia de análise proteômica global.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade através do ensaio do MTT;
- ✓ Análise proteômica global das células SKOV-3 por estratégia *shotgun*;
- ✓ Interpretação dos resultados junto ao software *PaternLab* e construção de redes de interação e heatmaps;
- ✓ Identificação de alterações na expressão de proteínas envolvidas em processos celulares importantes em células SKOV-3 posterior ao tratamento com melatonina;
- ✓ Correlação dos achados com dados de pacientes disponíveis em plataformas abertas.

6. REFERÊNCIAS

BRASSEUR, K.; GÉVRY, N.; ASSELIN, E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 3, p. 4008-4042, 2017.

BRETT, M.; PERMUTH, J. B.; THOMAS, A. S. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer Biol. Med.**, Tianjin, v. 14, n. 1, p. 9-32, 2017.

CHUFFA, L. G. A. *et al.* Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. **BMC Cancer**, London, v. 15, p. 34, 2015.

CHUFFA, L. G. A. *et al.* Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 23, n. 2, p. 65-76, 2016a.

CHUFFA, L. G. A. *et al.* Quantitative proteomic profiling reveals that diverse metabolic pathways are influenced by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma. **J. Proteome Res.**, Washington, v. 15, n. 10, p. 3872-3882, 2016b.

CHUFFA, L. G. A. *et al.* The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. **Steroids**, New York, v. 118, p. 93-108, 2017.

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

CHUFFA, L. G. A. *et al.* Mitochondrial functions and melatonina: a tour of reproductive cancers. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 76, n. 5, p. 837-863, 2018.

CLOVEN, N. G. *et al.* In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 92, n. 1, p. 160-166, 2004.

COOK, D. P.; VANDERHYDEN, B. C. Ovarian cancer and the evolution of subtype classifications using transcriptional profiling†. **Biol. Reprod.**, New York, v. 101, n. 3, p. 645-658, 2019.

CORNELISON, R.; LIANEZA, D.; LANDEN, C. N. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: a mini review. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 18, n. 10, p. 2171, 2017.

FAN, G. *et al.* A quantitative proteomic -based signature of platinum sensitivity in ovarian cancer cell lines. **Biochem. J.**, London, n. 465, v. 3, p. 433-442, 2015.

GAMARRA-LUQUES, C. D. *et al.* Resistance to cisplatin and paclitaxel does not affect the sensitivity of human ovarian cancer cells to antiprogesterin-induced cytotoxicity. **J. Ovarian Res.**, London, v. 7, p. 45, 2014.

GANDHI, A. V. *et al.* Melatonin is required for the circadian regulation of sleep. **Neuron**,

Cambridge, v. 85, n. 6, p. 1193-1199, 2015.

GUO, F.-J. *et al.* Effects of cyclooxygenase-2 gene silencing on the biological behavior of SKOV3 ovarian cancer cells. **Mol. Med. Rep.**, Boston, v. 11, n. 1, p. 59-66, 2015.

HO, C.-M. *et al.* Pure-type clear cell carcinoma of the ovary as a distinct histological type and improved survival in patients treated with paclitaxel-platinum-based chemotherapy in pure-type advanced disease. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 94, n. 1, p. 197-203, 2004.

HSIEH, S. F. *et al.* Prognostic factors of early stage epithelial ovarian carcinoma. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Basel, v. 16, n. 4, p. 1-12, 2019.

HU, W. *et al.* Snapshot: implications for melatonin in endoplasmic reticulum homeostasis. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 173, n. 24, p. 3431-3442, 2016.

HUANG, H. S. *et al.* Mutagenic, surviving and tumorigenic effects of follicular fluid in the context of p53 loss: initiation of fimbria carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1419-1428, 2015.

HUANG, Z. *et al.* Proteomic profiling of human plasma for cancer biomarker discovery. **Proteomics**, Weinheim, v. 17, n. 6, p. 1-13, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Estatística de câncer 2019**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

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

KIM, S. *et al.* Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer. **NPJ Precis. Oncol.**, London, v. 2, n. 20, p. 1-9, 2018.

LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **Eur. J. Cancer Prev.**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 55-62, 2017.

LEDERMANN, J. A. *et al.* Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann. Oncol.**, Boston, v. 24, p. vi24-vi32, 2013. Suppl. 6.

LENGYEL, E. Ovarian cancer development and metastasis. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 177, n. 3, p. 1053-1064, 2010.

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

LI, N.; ZHAN, X. Signaling pathway network alterations in human ovarian cancers identified with quantitative mitochondrial proteomics. **EPMA J.**, Cham, v. 10, n. 2, p. 153-172, 2019.

LISIO, M, A. *et al.* High-Grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic

standpoints. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 20, n. 4, p. 1-33, 2019.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drugs resistance. **J. Pathol.**, Chichester, v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005.

MENÉNDEZ-MENÉNDEZ, J.; MARTÍNEZ-CAMPA. Melatonin: an anti-tumor agent in hormone- dependent cancers. **Int. J. Endocrinol.**, Cairo, v. 2, n. 3, p. 3271948, 2018.

LI, N.; LI, H.; CAO, L.; ZHAN, X. Quantitative analysis of the mitochondrial proteome in human ovarian carcinomas. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 3, n. 25, p. 1-66, 2018.

OHLUND, D. *et al.* Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. **BMC Cancer**, London, v. 13, n. 1, p. 2-11, 2013.

PARIENTE, R. *et al.* Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. **J. Pineal Res.**, New York, v. 60, n. 1, p. 55-64, 2016.

REITER, R. J. *et al.* Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **J. Pineal Res.**, New York, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

REITER, R. J. *et al.* Inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase: a proposed mechanism by which melatonin causes cancer cells to overcome cytosolic glycolysis, reduce tumor biomass and reverse insensitivity to chemotherapy. **Melatonin Res.**, San Antonio, v. 2, n. 3, p. 105-119, 2019.

REITER, J. R. Melatonin inhibits Warburg-dependent cancer by redirecting glucose oxidation to the mitochondria: a mechanistic hypothesis. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 77, n. 13, p. 2527-2542, 2020.

ROJAS, V. *et al.* Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: Implications for diagnosis and treatment. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 17, n. 12, p. 2113, 2016.

SAWADA, K. *et al.* Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via $\alpha 5$ -integrin, which is a therapeutic target. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 68, n. 7, p. 2329-2339, 2008.

SHEN, C. J. *et al.* Melatonin suppresses the growth of ovarian cancer cell lines (OVCAR-429 and PA-1) and potentiates the effect of G1 arrest by targeting CDKs. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 17, n. 2, p. 176, 2016.

STENZEL, A. E.; ABRAMS, S. I.; MOYSICH, K. B. A call for epidemiological research on myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer: a review of the existing immunological evidence and suggestions for moving forward. **Front. Immunol.**, Lausanne, v. 10, p. 1608, 2019.

SYMOWICZ, J. *et al.* Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells.

Cancer Res., Baltimore, v. 67, n. 5, p. 2030-2039, 2007.

TAMURA, H. *et al.* Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertil. Steril.**, New York, v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

TOSCHES, M. A. *et al.* Melatonin Signaling Controls Circadian Swimming Behavior in Marine Zooplankton. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 1, p. 46-57, 2014.

TOSS, A. *et al.* Ovarian cancer: Can proteomics give new insights for therapy and diagnosis? **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 14, n. 4, p. 8271-8290, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global cancer observatory**. Geneva: WHO, 2018.

ZADEH, F. H. B. *et al.* Proteome profiling of low grade serous ovarian cancer. **J. Ovarian Res.**, London, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2019.

ZEMŁA, A. *et al.* Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of cisplatin in ovarian cancer cells independently of MT1 melatonin receptors. **In Vivo**, Attiki, v. 31, n. 5, p. 801-809, 2017.

ZHOU, Y. *et al.* Calycosin induces apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells by activating caspases and Bcl-2 family proteins. **Tumor Biol.**, Basel, v. 36, n. 7, p. 5333-5339, 2015.

ZONTA, Y. *et al.* Melatonin reduces angiogenesis in serous papillary ovarian carcinoma of ethanol-preferring rats. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 18, n. 12, p. 763, 2017.