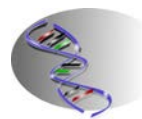




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

---



**RODRIGO VENTURA RODRIGUES**

**O EFEITO DA MELATONINA NA ANGIOGÊNESE E  
METÁSTASE DE LINHAGENS DE CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE BUCAL**

São José do Rio Preto, SP  
2013

Rodrigo Ventura Rodrigues

**O EFEITO DA MELATONINA NA ANGIOGÊNESE E  
METÁSTASE DE LINHAGENS DE CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE BUCAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora  
Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto  
2013

Rodrigues, Rodrigo Ventura.

O efeito da melatonina na angiogênese e metástase de  
linhagens de carcinoma epidermóide bucal / Rodrigo Ventura  
Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2013  
86 f. : il.

Orientador: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Câncer. 3. Boca - Câncer. 4. Linhagem  
(Genética) 5. Melatonina. I. Zuccari, Debora Aparecida Pires de  
Campos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Rodrigo Ventura Rodrigues

O efeito da melatonina na angiogênese e metástase de  
linhagens de carcinoma epidermóide bucal

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração - Biologia Molecular e Celular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora Aparecida Pires de Campos  
Zuccari  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Elizabete Silva  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílían Castiglioni  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Prado Ribeiro  
USP – São Paulo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dorotéia Rossi Silva Souza  
FAMERP – Rio Preto

São José do Rio Preto, 21 de outubro de 2013

Dedico este trabalho às pessoas que foram fundamentais para que este trabalho e sonho pudesse ser concretizado: à minha querida mãezinha Maria José, que já partiu deste plano, à minha amada e dedicada esposa Thalita, à minha querida orientadora Debora e ao meu “anjo da guarda” Naiane, que foi fundamental em todas as etapas deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e ao Plano Espiritual, que sempre fez de tudo para que as coisas dessem certo, proporcionando momentos de evolução importantes na minha vida...

À minha querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, incansável na sua paciência comigo e sempre positiva em todas as etapas do trabalho, além de demonstrar sua sabedoria e experiência para com todos que fizeram parte deste trabalho. Sem você não teria conseguido, e isso nunca vou esquecer. Conte comigo sempre!

Ao meu “anjo da guarda” Naiane, que começou sua vida científica comigo e participou de forma decisiva em todas as etapas do trabalho, principalmente cuidando de nossa “filhas”, as linhagens celulares.

À incansável amiga Jucimara Colombo, que colaborou e participou ativamente da Tese, com seu jeitinho carinhoso e tranquilo de ser... Obrigado!

À querida Bruna Victorasso, por todo o apoio incansável dado, especialmente no que tange à leitura e discussão de artigos e da tese. Grande parceira!

À grande amiga Juliana Lopes, que foi até buscar as linhagens em São Paulo uma vez! Obrigado por tudo...

A todos os amigos do LIMC: Gustavo, Marina, Thaís, Larissa, Camila, Lívia, Gabriela e todos os que participaram de forma direta e indireta na Tese... Equipe maravilhosa e competente!

Ao grande parceiro Hubert, por todos os momentos de irmandade e descontração, que tornou essa fase menos pesada. Valeu mano!

À grande irmã Agdamar, que sempre me deu apoio incondicional a realizar o doutorado, e facilitou minha vida no serviço para que pudesse concluir esta fase. Muito obrigado!

À minha querida irmã Lílian, que foi a mola propulsora para que pudesse começar o doutorado, e serviu de conexão entre a Professora Debora e eu. Obrigado por tudo, e fico feliz de você participar da coroação deste momento!

Ao querido Professor Elyseu, que sempre serviu de modelo inspirador para que eu pudesse chegar onde estou hoje. Obrigado pela experiência no alto dos seus 82 anos.

A todos os queridos irmãos da UNIRP, sempre dando apoio importante para que pudesse realizar o doutorado, dentre alguns em especial: Heloísa, Maristela, Gilberto, Edgar, Alexandre, Simone entre outros, fundamentais à concretização deste momento.

Ao Dr. Halim e à Dra Manuela, que incentivaram e permitiram que eu me ausentasse em alguns momentos no trabalho, para poder terminar o doutorado. Obrigado, e esse momento é uma vitória nossa!

Aos meus queridos sogros Dulce e Ronaldo, que sempre me incentivaram e deram muita força nos momentos difíceis da vida... Obrigado!!!

Aos meus queridos primos-irmãos Vanessa e Roberto, que fizeram muitos momentos felizes em nossa vida, relaxando e tranquilizando a vida, para que o mundo não fosse tão cinza. Obrigado!

Ao Programa de Pós Graduação em Genética da UNESP de São José do Rio Preto pelas orientações burocráticas e pelo apoio financeiro para congressos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao laboratório.

E, finalmente, agradecer a minha querida esposa Thalita, com sua inabalável fé e confiança no futuro, e com o carinho e amor que cuidou de mim, na fase legal, na fase chata, enfim, uma companheira ideal. Te amo!



“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

Thomas Edison

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

## RESUMO

O câncer oral é o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço e o seu alto índice de mortalidade e morbidade está intimamente relacionado com os processos de angiogênese e metástase. A superexpressão do fator induzível por hipóxia - *HIF1-α* -, do fator de crescimento endotelial vascular – *VEGF* - e da quinase associada à proteína Rho - *ROCK1* - estão relacionados com prognóstico desfavorável em carcinoma oral. A melatonina apresenta propriedades oncostáticas, antiangiogênicas e antimetastáticas em vários tipos de neoplasias, no entanto, a sua ação no câncer oral é pouco explorada. O presente trabalho teve por objetivo analisar expressão dos genes nos processos de angiogênese e metástase em linhagens de carcinoma epidermóide de língua, após tratamento com melatonina. As linhagens SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 foram testadas, e as linhagens SCC9 e SCC25 foram selecionadas para este trabalho. A ação da melatonina foi verificada em condições de normóxia e hipóxia por qRT-PCR quantitativa e por imunocitoquímica, na expressão gênica e proteica de *HIF1-α*, *VEGF* e *ROCK1*. Os resultados demonstraram que houve diminuição da viabilidade celular em ambas as linhagens após o tratamento com melatonina. A análise gênica mostrou a inibição da expressão dos genes proangiogênicos *HIF1-α* ( $P < 0,001$ ) e *VEGF* ( $P < 0,001$ ) em condições de hipóxia, e do gene prometastático *ROCK1* ( $P < 0,0001$ ) na linhagem SCC9, após tratamento com 1 mM de melatonina. A análise imunocitoquímica confirmou os dados de expressão gênica, validando os resultados de qRT-PCR quantitativa da linhagem SCC9. O tratamento com melatonina não demonstrou inibição da expressão dos genes *HIF-1α*, *VEGF* e *ROCK1* na linhagem SCC25, a qual apresenta características moleculares diferenciadas e um grau de malignidade maior quando comparada à linhagem SCC9. Em conclusão a melatonina reduziu a viabilidade celular na linhagem SCC25 e inibe a expressão dos genes *HIF1-α*, *VEGF* e *ROCK1* na linhagem SCC9. A potencial ação terapêutica da melatonina nestes subtipos de carcinoma oral poderá ser confirmada em outros estudos.

**Palavras-chave:** câncer oral, linhagem celular, *VEGF*, *HIF1-α*, *ROCK1*, melatonina

## ABSTRACT

Oral cancer is the most common type of cancer of the head and neck and its high mortality and morbidity is closely related to the processes of angiogenesis and metastasis. Overexpression of Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  - *HIF1* -  $\alpha$  -, Vascular Endothelial Growth Factor - *VEGF* - and Rho-associated serine-threonine protein kinase - *ROCK1* - are related to poor prognosis in oral carcinoma. Melatonin has oncostatics, antiangiogenic and antimetastatic properties in several types of cancer, however, its action in oral cancer is underexplored. This study aimed to analyze the expression of genes in the process of angiogenesis and metastasis in squamous cell carcinoma cell lines of tongue after treatment with melatonin. The lines SCC4, SCC9, SCC15 and SCC25 were tested, and the lines SCC9 and SCC25 were selected for this study. The action of melatonin was observed under conditions of normoxia and hypoxia by quantitative qRT-PCR and immunocytochemistry in gene and protein expression of *HIF1* -  $\alpha$  , *VEGF* and *ROCK1*. The results showed that there was a decrease in cell viability in SCC25 strains after the treatment with melatonin. The analysis showed the inhibition of gene expression of proangiogenic genes *HIF1* -  $\alpha$  ( $P < 0.001$ ) and *VEGF* ( $p < 0.001$ ) under hypoxic conditions and prometastatic gene *ROCK1* ( $P < 0.0001$ ) in the line SCC9 , after treatment with 1 mM melatonin. The immunocytochemistry analysis confirmed the gene expression data, validating the results of quantitative qRT-PCR of lineage SCC9. Treatment with melatonin did not show inhibition of the expression of *HIF-1 $\alpha$*  , *VEGF* and *ROCK1* in the line SCC25, which has different molecular characteristics and degree of malignancy greater when compared to the line SCC9. In conclusion melatonin affects cell viability in the strains SCC9 and SCC25 and inhibits gene expression of *HIF1* -  $\alpha$  , *VEGF* and *ROCK1* in the line SCC9. The potential therapeutic effect of melatonin in these subtypes of oral cancer can be confirmed in other studies .

Keywords : oral cancer, cell line , *VEGF* , *HIF1* -  $\alpha$  , *ROCK1* , melatonin.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                    | 13 |
| 1.1 A hipóxia e a expressão gênica do <i>HIF-1α</i> e <i>VEGF</i> , a angiogênese e o prognóstico do carcinoma epidermóide oral ..... | 15 |
| 1.2 A expressão gênica de <i>ROCK-1</i> , a metástase e o carcinoma oral epidermóide .....                                            | 21 |
| 1.3 A melatonina .....                                                                                                                | 23 |
| 2 OBJETIVOS .....                                                                                                                     | 27 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                            | 29 |
| 3.1 Cultura Celular .....                                                                                                             | 30 |
| 3.2 Tratamento de células in vitro .....                                                                                              | 32 |
| 3.3 Teste de viabilidade celular pelo Ensaio MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) .....                          | 32 |
| 3.4 RT-PCR quantitativa (qPCR) .....                                                                                                  | 33 |
| 3.5 Análise Estatística dos dados de qPCR .....                                                                                       | 34 |
| 3.6 Análise imunocitoquímica .....                                                                                                    | 34 |
| 3.7 Avaliação da coloração imunocitoquímica por densitometria óptica .....                                                            | 35 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                         | 36 |
| 5 CONCLUSÕES .....                                                                                                                    | 64 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                    | 66 |

## **1- INTRODUÇÃO**

---

## 1 – INTRODUÇÃO

O câncer oral é o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço, com incidência anual de aproximadamente 300.000 novos casos, sendo mais prevalente em homens (KADEMANI, 2007). Dentre todos os tipos de câncer oral, o carcinoma epidermóide bucal (CEB) representa 90% a 95% dos casos (ANIS; GABALLAH, 2013). No Brasil, 14.000 novos casos são diagnosticados todo ano (INCA, 2012).

Os fatores de risco envolvidos em seu desenvolvimento são principalmente o consumo de tabaco e/ou álcool (TANG et al., 2013).

Os principais métodos de tratamento do CEB são a radioterapia e a quimioterapia, após tratamento cirúrgico (HUNG et al., 2013). As lesões avançadas geralmente não são dolorosas quando afetam a parte lateral e ventral da língua e a região posterior da orofaringe. Pelo fato das lesões serem mais prevalentes nestas áreas de difícil visualização, o diagnóstico escapa da detecção precoce, o que determina a intervenção cirúrgica agressiva, seguida de quimioterapia e radioterapia para estabelecer o controle local (ZHOU et al., 2012).

Apesar dos avanços nas abordagens terapêuticas, o índice de sobrevivência de 5 anos do CEB permanece por volta de 50% (CHIN et al., 2006). Pozzi et al. (2013) relatam que a sobrevivência, de forma geral, não melhorou de forma significativa nas últimas três décadas e que a elevada mortalidade pelo CEB é atribuída ao diagnóstico tardio e a ocorrência de metástase linfonodal, desfavorecendo o prognóstico de pacientes com este tipo de câncer. As metástases regionais no CEB são prevalentes em pelo menos 30% dos casos (ANIS; GABALLAH, 2013).

A sobrevivência de pacientes com CEB após a terapia cirúrgica tem sido correlacionada ao tamanho do tumor, à presença de metástase linfonodal, ao estágio do tumor e sua diferenciação celular. Ainda não existe na literatura uma posição definida quanto à sobrevivência em pacientes pós-radioterapia e pós-quimioterapia (TANG et al., 2013).

A recidiva ocorre em 10% a 30% dos pacientes com tumores com margens cirúrgicas livres, verificadas por exame histopatológico. A ocorrência de um segundo tumor primário é de 10% a 35%, dependendo da localização do

primeiro tumor primário e da idade dos pacientes com CEB (CANKOVIC et al., 2013). Os pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço podem desenvolver lesões múltiplas em diferentes sítios anatômicos, estando esse padrão multifocal de acordo com o modelo proposto por Slaughter et. al. (1953) denominado “cancerização de campo”. Esse modelo baseia-se na exposição repetida de um campo aos mesmos fatores de risco, como os carcinógenos presentes no álcool e no tabaco, levando ao desenvolvimento de lesões independentes.

### **1.1. A hipóxia e a expressão gênica do HIF-1 $\alpha$ e VEGF, a angiogênese e o prognóstico do carcinoma epidermóide oral**

O crescimento e progressão tumoral, assim como o desenvolvimento de metástases, dependem da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da proliferação e migração de células endoteliais preexistentes (CAO et al., 2005; AL-DISSI et al., 2010; AMBASTA et al., 2011; FINLEY et al., 2013). Os vasos sanguíneos são indispensáveis para o desenvolvimento de tumores sólidos, não só para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, mas também para a retirada do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e dos resíduos metabólicos, além de servirem como um importante caminho para as células malignas migrarem para outros tecidos, possibilitando o desenvolvimento de um segundo tumor primário (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2013).

Na ausência de oxigênio, glicose e neovasculogênese adequada, os tumores não podem crescer além de uma dimensão crítica e promover a disseminação metastática (CARMELIET; JAIN, 2000). No entanto, uma vez que o tumor excede alguns milímetros de diâmetro, a hipóxia no microambiente tumoral desencadeia uma cascata de eventos, induzindo a vascularização e crescimento tumoral (LEE et. al., 2007).

A hipóxia é caracterizada pela redução dos níveis fisiológicos normais de oxigênio nos tecidos, podendo ocorrer durante o desenvolvimento de doença vascular aguda ou crônica, doenças pulmonares e do câncer (HARRIS, 2002).

Duas principais condições de hipóxia são conhecidas. A primeira, denominada hipóxia crônica ou difusão-limitada ocorre devido à proliferação descontrolada das células e crescimento rápido do tumor resultando em

distâncias longas de difusão de oxigênio do vaso sanguíneo mais próximo (CARMELIET; JAIN, 2000; HARRIS, 2002; VORDERMARK, 2010), e a segunda, conhecida como hipóxia aguda, é caracterizada pela estrutura caótica dos novos vasos sanguíneos formados resultando na perfusão inadequada em parte do tecido (CARMELIET; JAIN, 2000; HARRIS, 2002; MILANI; HARRIS, 2008).

A hipóxia é tóxica tanto para as células normais quanto para as tumorais e de acordo com sua gravidade, pode promover apoptose ou pelo contrário, impedir a morte celular, desencadeando uma série de respostas biológicas, levando à proliferação das células e ao crescimento do tumor, contribuindo para um comportamento tumoral mais agressivo (FLAMANT et al., 2010). Diferente das células normais, para manter a sobrevivência em situações de hipóxia, as células tumorais têm como característica comum a capacidade de promover alterações em sua funcionalidade, tornando-se resistentes à apoptose, sendo capaz de induzir sua própria vascularização iniciando o processo de angiogênese (LEE et al., 2007).

Além disso, em condições de hipóxia, essas células iniciam mecanismos adaptativos, como alteração do metabolismo, a produção e liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a ativação de fatores induzidos por hipóxia (HIFs) envolvidos no processo de angiogênese (KALLERGI et al., 2009; RUAN et al., 2009; HIGASHIMURA et al., 2011). Dessa forma, a hipóxia desempenha um importante papel na modulação da angiogênese tumoral e está relacionada com o aumento da agressividade tumoral (MILANI et al., 2008). Do ponto de vista clínico, a hipóxia das células tumorais é um conhecido fator prognóstico adverso ao tratamento do câncer, tanto para radioterapia quanto para a quimioterapia (DACHS et al., 2010).

O processo de angiogênese é regulado pelo equilíbrio entre inúmeros fatores pró e antiangiogênicos (TANG et al., 2013). Em processos patológicos como no desenvolvimento do câncer, ocorre um desequilíbrio entre esses fatores, sendo que um dos principais fatores proangiogênicos específicos para o endotélio vascular e mediador do processo de angiogênese é o *VEGF* (SEMENZA, 2002; KIM et al., 2004; SHIN et al., 2013; TANG et al., 2013).

O gene *VEGF* promove angiogênese através de sua capacidade de regular a permeabilidade vascular, estimular o crescimento, migração e invasão

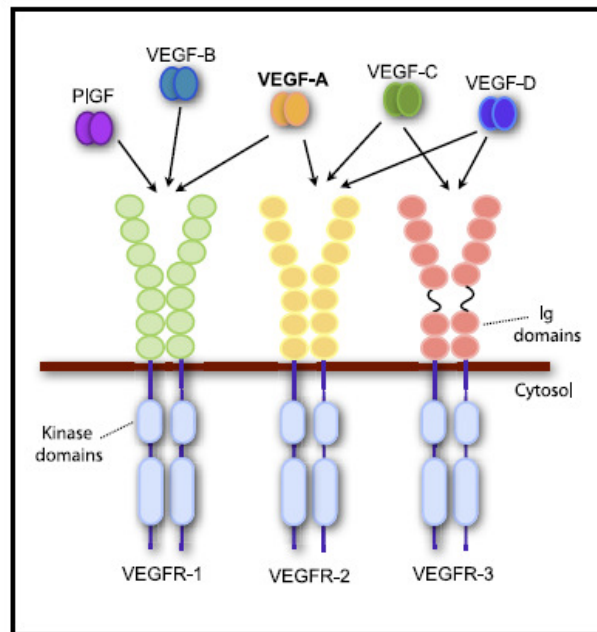


das células endoteliais. Esse fator pertence à família de fatores de crescimento derivados de plaquetas e foi originalmente referido como fator de permeabilidade vascular. É uma glicoproteína homodimérica que possui várias isoformas descritas nos mamíferos, denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF). Entre estes, o VEGF-A é o mais amplamente estudado e melhor descrito na literatura (SENGER et al., 1983).

Vários tipos de células, tais como as células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos e células imunitárias (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos), podem produzir e liberar o VEGF (AZZI et al., 2013), que atua tanto de forma autócrina como parácrina. Além disso, no tecido tumoral, as células do tumor constituem uma fonte importante de VEGF (FOLKMAN, 2006). A sinalização autócrina e parácrina mediada pelo VEGF e seus receptores contribuem para o aumento da proliferação de células cancerosas (SYED KHAJA et al., 2013).

O VEGF apresenta sinalização intracelular mediada por três receptores de tirosina-quinase, denominados VEGF-R1, VEGF-R2 e VEGF-R3, bem como alguns correceptores, como as neuropilinas. A ligação do ligante aos seus receptores induz a sua dimerização, autofosforilação, e a transdução do sinal subsequente (WALTENBERGER et al., 1994).

O VEGF-A se liga à dois receptores específicos, o VEGFR-1 e o VEGFR-2 enquanto o VEGF-B e PLGF são reconhecidos apenas pelo receptor VEGFR-1. O VEGF-C e VEGF-D se ligam ao VEGFR-2 e também são reconhecidos pelo VEGFR-3 (Figura 1) (RAHIMI, 2012). O VEGF-A e o VEGF-B são os mais importantes reguladores do processo de angiogênese, enquanto o VEGF-C e VEGF-D estão especificamente envolvidos na linfoangiogênese (MILLANTA et al., 2006; BRITO et al., 2011).



**Figura 1.** Esquema da ligação entre as isoformas do fator de crescimento endotelial vascular - VEGF - e seus receptores. Adaptado de RUIZ DE ALMODOVAR et al., 2009.

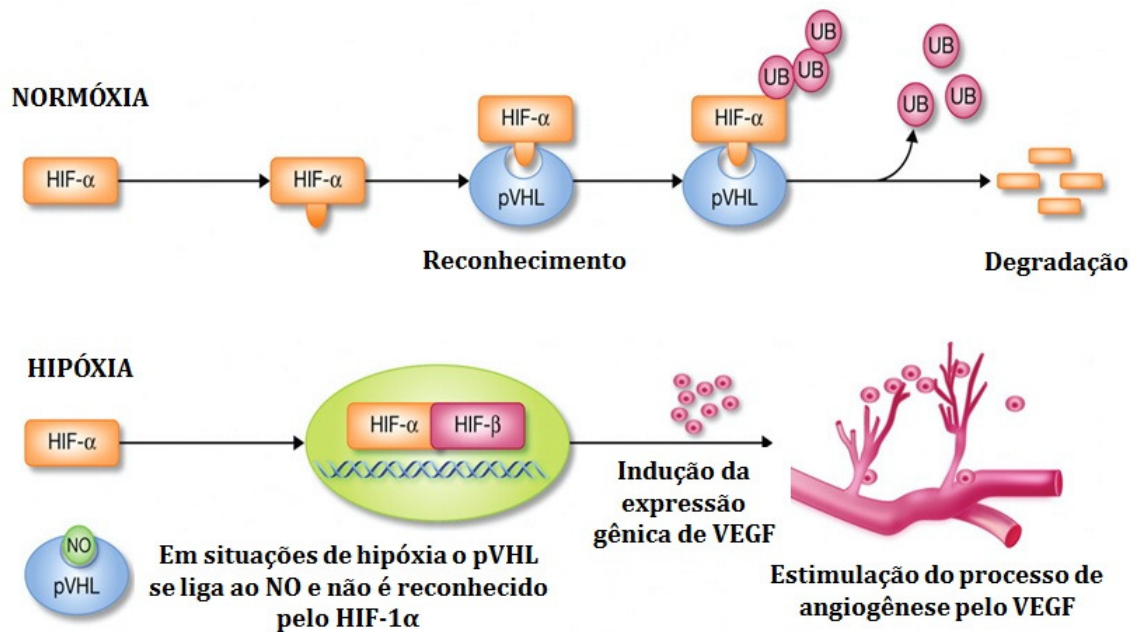
Apesar do VEGF-A interagir com o VEGFR-1 e VEGFR-2, apenas o VEGFR-2 está diretamente envolvido na permeabilidade vascular normal e patológica (OLSSON et al., 2006). O gene *VEGF-R1* é descrito como um regulador da sinalização de *VEGF-R2*, podendo regular indiretamente a permeabilidade vascular (AZZI et al., 2013). A ligação entre o VEGF-A e o VEGFR-2 está associada à proliferação das células tumorais, sendo a ativação do VEGFR-2 considerada o mais importante passo do processo de angiogênese (REINMUTH et al., 2001; SEMENZA, 2002; BERGERS; BENJAMIN, 2003; GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003; KIM et al., 2004; PRADEEP, 2005; MILKIEWICZ et al., 2006; MILLANTA et al., 2006; STEFANINI et al., 2008; RUIZ DE ALMODOVAR et al., 2009; AL-DISSI et al., 2010; FERRARA, 2010; PARK et al., 2010; ZHANG et al., 2010; BRITO et al., 2011; CHERESH, 2011; PANDE et al., 2011; HILMI et al., 2012; RAHIMI, 2012; CAPPELLARI; COSSU, 2013; CLINKARD et al., 2013; FINLEY et al., 2013; LIU; OUYANG, 2013; WEIS; TANG et al., 2013).

O *VEGF* é superexpresso no estroma celular de tumores, bem como em células de câncer renal, câncer de pulmão, câncer de mama e câncer de ovário (SYED KHAJA et al., 2013). Recentemente, existem diversos estudos sobre a

expressão de *VEGF* em células tumorais no carcinoma da cavidade oral ou de cabeça e pescoço de células escamosas e em outros tumores malignos (STÎNGĂ et al., 2011). Em células tumorais de CEB, o VEGFR1 e VEGFR2 apresentam maior expressão no interior do tumor, e estão correlacionados com parâmetros clínico-patológicos, tais como localização, grau e diferenciação celular. Estes dados sugerem que a sinalização de VEGFR1 e VEGFR2 pode não só mediar a neovascularização associada com a progressão do tumor, mas também contribuir diretamente para a estimulação e regulação das células de carcinoma oral por meio de mecanismos autócrinos e/ou parácrinos (STÎNGĂ et al., 2011).

A expressão do *VEGF* nas células do câncer está sob o controle do fator induzível por hipóxia - 1 (HIF-1), que é um fator de transcrição induzido sob hipóxia e que nestas condições, migra do citoplasma para o núcleo das células, ligando-se a elementos de resposta à hipóxia, conduzindo à expressão de genes, principalmente o *VEGF* (KALLERGI et al., 2009; BRITO et al., 2011; SHIN et al., 2013).

O complexo transcricional HIF-1 é composto por dois polipeptídios: as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Enquanto a subunidade  $\beta$  é expressa constitutivamente, a atividade de HIF-1 é regulada de forma pós-transcricional pelas subunidades  $\alpha$ , que são estabilizadas ou degradadas em condições de baixa ou alta tensão de oxigênio, respectivamente (ZHOU et al., 2012). Em situações normais de oxigênio, o HIF-1 $\alpha$  é reconhecido pela proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL), ubiquitinizado e ao final sofre degradação proteossomal. No entanto, em situações de hipóxia, o pVHL se liga ao óxido nítrico e o HIF-1 $\alpha$  não é reconhecido. Nesse caso, o HIF-1 $\alpha$  é ativado e induz a expressão de genes de resposta à hipóxia, como o *VEGF*, que por sua vez estimula o processo de angiogênese (Figura 2) (SEMENZA et al., 2002; MIMEAULT; BATRA, 2013; LI et al., 2003; TUNG et al., 2013).



**Figura 2.** Ativação do fator induzível por hipóxia - HIF-1 $\alpha$  - em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia). Adaptado de RAHIMI, 2012.

Como um fator de transcrição, o HIF-1 $\alpha$  regula genes que estão envolvidos na formação do tumor, no metabolismo, na angiogênese, na expressão de oncogenes que regulam a metástase e entre outros fatores envolvidos na doença (WEI et al., 2013). No entanto, sua relação com a progressão e resposta ao tratamento de tumores em câncer de cabeça e pescoço ainda é pouco compreendida (DOS SANTOS et al., 2012).

Estudos têm evidenciado que a superexpressão de *HIF-1 $\alpha$*  (LIU et al., 2008; ECKERT et al., 2012) e *VEGF* (NARUSE et al., 2011; ZHAO et al., 2013) correlacionam-se com progressão tumoral e prognóstico desfavorável em carcinoma oral. Uma vez que o carcinoma oral é um tumor localmente agressivo que apresenta grandes áreas de necrose, os níveis de hipóxia são muito altos, o que favorece o desenvolvimento de resistência à drogas e a baixa resposta à quimioterapia (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2011). A invasão local e metástase em linfonodos cervicais e mais tardiamente para outros órgãos como pulmão, ossos e fígado, também são eventos frequentes no carcinoma oral e contribuem para o seu prognóstico ruim (ISLAN et al., 2013).

No CEB, os altos níveis da subunidade HIF-1 $\alpha$  estão correlacionados com o pior prognóstico, redução da sobrevida e progressão tumoral, com crescimento da lesão primária e da metástase linfonodal. O *HIF-1 $\alpha$*  também é abundante na maioria dos pacientes com carcinoma de células epidermóide da orofaringe e também correlacionado a menor taxa de remissão, maior incidência de metástases linfáticas, e menor sobrevida (ZHOU et al., 2012).

A angiogênese e a reconfiguração da vascularização pré-existente são essenciais para o crescimento de tumores e metástases. O aumento da vascularização do tumor pode denotar um pior prognóstico para os pacientes, em vários tipos de carcinomas (AL-GREENE et al., 2013). O papel dos fatores proangiogênicos nas neoplasias tem recebido uma atenção crescente nos últimos tempos, uma vez que pode ser utilizada como indicador de prognóstico para a progressão de tumores e metástases. Também pode ser relacionada como um segundo alvo para terapia antineoplásica, ao invés da inibição da célula tumoral direta (KAPOOR; DESHMUCK, 2012).

## **1.2. A expressão gênica de *ROCK-1*, a metástase e o carcinoma oral epidermóide**

A metástase é um processo de vários estágios e se caracteriza por uma série de alterações fenotípicas e bioquímicas, incluindo a alteração da expressão gênica, angiogênese, linfagiogênese, motilidade e alterações morfológicas celulares (STEEG; THEODORESCU, 2008).

Os passos mais críticos da metástase são a migração e invasão celular que colaboram com a malignidade do tumor. Células metastáticas são altamente migratórias e invasivas por terem um citoesqueleto mal estruturado, facilitando a organização dinâmica que permite o movimento celular, além de pouca adesão ao seu substrato (ORTÍZ-LÓPEZ et al., 2009). A remodelação do citoesqueleto de actina e todo o processo de movimentação celular são regulados por pequenas GTPases da família Rho, principalmente RhoA, RhoC, Cdc42 e Rac (KOSLA et al., 2013).

As proteínas quinases associadas a Rho 1 e 2 (ROCK-1 e ROCK1-2) pertencem a uma família de quinases serina/treonina, efetoras das GTPases Rho A, B e C. Essas duas isoformas (ROCK-1 e ROCK-2) foram identificadas na proporção de 64% e 79% em relação à identidade da sequência e

similaridade global, respectivamente. Além disso, possuem 92% de identidade e 97% de semelhança nos seus domínios quinase (SHI et al., 2007; PATEL et al., 2013).

As duas isoformas são distribuídas de forma diferente nos tecidos orgânicos. A ROCK-1 é expressa no pulmão, fígado, estômago, baço, rim e testículos, enquanto a ROCK-2 é altamente expressa no cérebro, coração e músculos (PIREDDU et al., 2012). Apesar de pouco ser conhecido sobre suas diferenças funcionais (PIREDDU et al., 2012), estudos têm demonstrado que as duas isoformas *ROCK* têm funções distintas (MORGAN-FISHER et al., 2013).

A expressão de ROCK-1 é necessária para muitos processos dependentes do citoesqueleto, incluindo a adesão celular, motilidade e fagocitose. Como reguladores de tais processos celulares, ROCK-1 é um agente importante na contratilidade do músculo liso e no desenvolvimento e regeneração neuronal (WANG et al., 2009).

O modelo Rho/ROCK-1 é um dos principais reguladores do citoesqueleto de actina e sua desregulação relaciona-se com o aumento da motilidade e invasibilidade das células neoplásicas, contribuindo para o comportamento metastático de alguns tipos de tumores, como câncer de pâncreas (KANEKO et al., 2002), de bexiga (KAMAI et al., 2003), de mama (RAVIRAJ et al., 2012) e de pulmão (VIGIL et al., 2012). Estudos têm evidenciado que a superexpressão de proteínas ROCK-1 em tecido tumoral está associada com prognóstico desfavorável e redução da sobrevida de pacientes com câncer de mama (LANE et al., 2008; LIU et al., 2009; RAVIRAJ et al., 2012).

O trabalho de He et al. (2010) mostrou ainda que o gene *VEGF* pode aumentar as concentrações de ROCK-1 no câncer de colo de útero. Demonstrou-se neste estudo que *VEGF-C* pode ativar a cascata de ativação do RhoA/ROCK1-2 em células de câncer do colo do útero, conduzindo à migração e invasão celular.

### 1.3. A melatonina

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), um neuro-hormônio pertencente ao grupo das indolaminas, é uma molécula altamente conservada evolutivamente, apresentando funções decorrentes de sua produção noturna em todos os grupos de seres vivos, desde organismos unicelulares até o homem (TAMURA, 2009).

Este hormônio é produzido na glândula pineal e secretado na corrente sanguínea (WANG et al., 2012). A glândula pineal é considerada o principal órgão produtor de melatonina, mas diversos outros tecidos ou células, incluindo os macrófagos e monócitos, possuem a capacidade de produzi-la (WANG et al., 2012).

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é capturado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes na fase escuro. O 5-HTP, descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, gera a serotonina, que é metabolizada durante a fase de escuro à *N*-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AA-NAT). Posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) dando como produto final a melatonina (TAMURA, 2009).

Devido ao seu pequeno tamanho e natureza anfifílica, a melatonina não é estocada nos pinealócitos. Imediatamente após a sua síntese, atravessa os capilares dos pinealócitos e atinge facilmente todos os compartimentos celulares e subcelulares (KORF et al., 1998; PARADIES et al., 2010).

A síntese de melatonina é passível de controle pela luz, sendo exclusivamente durante a noite e quase nenhuma síntese no período diurno (HISSA et al., 2008; DANIELCZYK; DZIEGIEL, 2009; MUHLBAUER et al., 2012).

A produção aumentada de melatonina durante a noite se deve a indução da enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AA-NAT). Esta enzima não é induzida quando a luz está presente sobre a retina, portanto, a luz durante a noite (LAN) atenua a produção de melatonina (KACZOR, 2010). A sua síntese é iniciada por sinais neurais que informam a falta de iluminação sobre a retina.

Um pico de luz leva à degradação da AA-NAT pelo proteassoma e inibe a transcrição do gene *aa-nat* (TAMURA, 2009).

Além disso, as concentrações séricas da melatonina variam consideravelmente de acordo com a idade. Ela é máxima nos primeiros anos de vida, caindo imediatamente na puberdade e tornando-se mínima com a idade avançada. Dessa forma, a melatonina tem um importante papel na determinação das modificações fisiológicas associadas ao ciclo de vida (crescimento, amadurecimento e envelhecimento) (HISSA et al., 2008).

A melatonina exerce alguns dos seus efeitos fisiológicos através de receptores de membrana. Estes receptores são encontrados associados à proteína G e são classificados de acordo com suas características farmacológicas, em Mel1A, Mel1B e Mel1C. Os subtipos Mel1A e Mel1B, agora denominados MT1 e MT2, respectivamente, foram identificados em humanos. O subtipo MT3 parece estar relacionado a enzima quinona redutase, embora sua função permaneça desconhecida (GARCÍA-NAVARRO et al., 2007).

Esse hormônio influencia o ritmo de vários processos fisiológicos durante a noite: a digestão torna-se mais lenta, a temperatura corporal cai, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea diminuem e o sistema imunológico é estimulado (MAGANHIN et al., 2008). Sabe-se que a alteração do ritmo circadiano da melatonina em profissionais que realizam turnos noturnos aumenta a incidência de alguns tipos de tumores (SCHERNHAMMER; HANKINSON, 2009).

Dessa forma, o potencial terapêutico da melatonina ultrapassa o tratamento de distúrbios do sono, e exhibe propriedades neuroprotetoras e antitumorais em muitas condições experimentais (RODRIGUEZ et al., 2013). A melatonina também foi relatada como eficaz nos casos de doença de Alzheimer (PANDI-PERUMAL et al., 2013), obesidade (PRUNET-MARCASSUS et al., 2003), doenças cardiovasculares (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2012) e doenças ósseas (SANCHEZ-BARCELO et al., 2010), isoladamente ou em combinação com outras drogas.

No tratamento do câncer, a melatonina parece ser um agente promissor (REITER et al., 2007) e tem sido demonstrado seu potencial na inibição tumoral, tanto em estudos *in vitro* como em estudos *in vivo* (GARCÍA-SANTOS



et al., 2006; MARTÍN et al., 2006; MILLER et al., 2006; LUCHETTI et al., 2010; CUTANDO et al., 2012).

Recentemente, estudos têm demonstrado que esse hormônio exerce atividade oncostática por meio de vários mecanismos incluindo ações antiproliferativas, estimulação da imunidade anticâncer, modulação da expressão de oncogenes, efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiangiogênicos e antimetastáticos (DI BELLA et al., 2013). Além disso, sugere-se que a melatonina pode ser administrada com sucesso em oncologia médica no tratamento de doentes com câncer avançado e para a prevenção dos efeitos secundários da quimioterapia (CENGIZ et al., 2012).

As primeiras correlações entre a glândula pineal e o combate ao câncer datam do final do século XIX, quando alguns médicos já ofereciam extratos de pineal a seus pacientes oncológicos (NETO; SCALDAFERRI, 2005). A partir de 1981, surgiram os primeiros indícios de que a melatonina poderia ser útil no tratamento oncológico através de estudos com o câncer de mama (NETO; SCALDAFERRI, 2005).

A partir dessa constatação, diversos mecanismos de ação dos efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina têm sido propostos não só no câncer de mama como também no câncer de próstata, de pele, de fígado, de rim, entre outros (VIJAYALAXMI et al., 2002; JUNG; AHMAD, 2006; MARTÍN et al., 2006; OPREA-ILIES et al., 2013). Entretanto, o mecanismo oncostático da melatonina não é totalmente esclarecido (DONG et al., 2012).

Tem sido demonstrado que a melatonina exerce uma atividade antiangiogênica, reduzindo a secreção do VEGF e consequentemente o crescimento tumoral (DAI et al., 2008). Além disso, a melatonina inibe a expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em células de câncer de próstata (PARK et al., 2009) e de glioblastoma (ZHANG et al., 2012), como também a expressão de *VEGF* em células de câncer de mama (ALVAREZ-GARCIA et al., 2012), de pâncreas (LV et al., 2012), de fígado (CARBAJO-PESCADOR et al., 2013) e de glioblastoma (ZHANG et al., 2013). Mais recentemente, descobriu-se que a melatonina possui propriedades modulatórias do citoesqueleto capazes de inibir a invasividade de células cancerosas (ORTIZ-LOPEZ et al., 2009). Alguns trabalhos têm demonstrado que a melatonina inibe o processo de migração e invasão em linhagem tumoral de rim canina e em células de câncer de mama

via proteína *ROCK-1* (RAMÍREZ-RODRÍGUEZ et al., 2007; ORTIZ-LOPEZ et al., 2009).

Em relação à concentração da dose eficaz de melatonina algumas células tumorais, como as células do câncer da próstata independentes de androgênio e células do glioma, são insensíveis a concentrações nanomolares de melatonina, respondendo a concentrações milimolares (SAINZ et al., 2005; MARTÍN et al., 2006).

Quanto à cavidade oral, a melatonina parece exercer um papel protetor com relação a danos teciduais causados por estresse oxidativo. Sabe-se que a melatonina é considerada um detoxificador de espécies reativas de oxigênio, bem como um antioxidante de largo espectro, estimulando várias enzimas antioxidantes (REITER, 2004; RAVINDRA et al., 2006). Dessa forma, estudos evidenciam que esse hormônio tem um efeito benéfico em certas patologias orais incluindo periodontites, infecção pelo vírus da herpes, cândida, xerostomia, úlceras orais e lesões pré-neoplásicas (GÓMEZ-MORENO et al., 2010).

Em relação ao câncer oral, tem-se estudado que a restauração exógena da expressão do receptor 1 A (MTNR1A) de melatonina inibe o crescimento de células de carcinoma epidermóide oral (CHAIYARIT et al., 2005). Em conjunto com as funções conhecidas de supressão tumoral da melatonina e a presença do receptor MTNR1A em vários tumores, é provável que um alvo de silenciamento epigenético de MTNR1A no *locus* 4q35 possa desempenhar um papel negativo durante a carcinogênese oral (NAKAMURA et al., 2008).

Uma vez que o carcinoma oral apresenta alto índice de mortalidade e morbidade, é crescente o interesse pela identificação de novos agentes terapêuticos que possam interagir com marcadores moleculares específicos, principalmente relacionados com angiogênese e metástase, inibindo a progressão do tumor. Além disso, não há trabalhos na literatura internacional que correlacionem a ação da melatonina com expressão de *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* e *ROCK-1* em câncer bucal.

## **2 - OBJETIVOS**

---

## 2 – Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da melatonina na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de angiogênese e de metástase em linhagens de carcinoma epidermóide bucal.

Como objetivos específicos, pretendeu-se:

- avaliar a expressão gênica e proteica de *HIF-1 $\alpha$*  e *VEGF* em linhagens de carcinoma epidermóide bucal, com e sem tratamento com melatonina, induzidos ou não à hipóxia, por meio de PCR em tempo real e Imunocitoquímica;

- avaliar a expressão gênica e proteica de *ROCK-1* em linhagens de carcinoma epidermóide bucal, com e sem tratamento com melatonina, por meio de PCR em tempo real e Imunocitoquímica.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

---

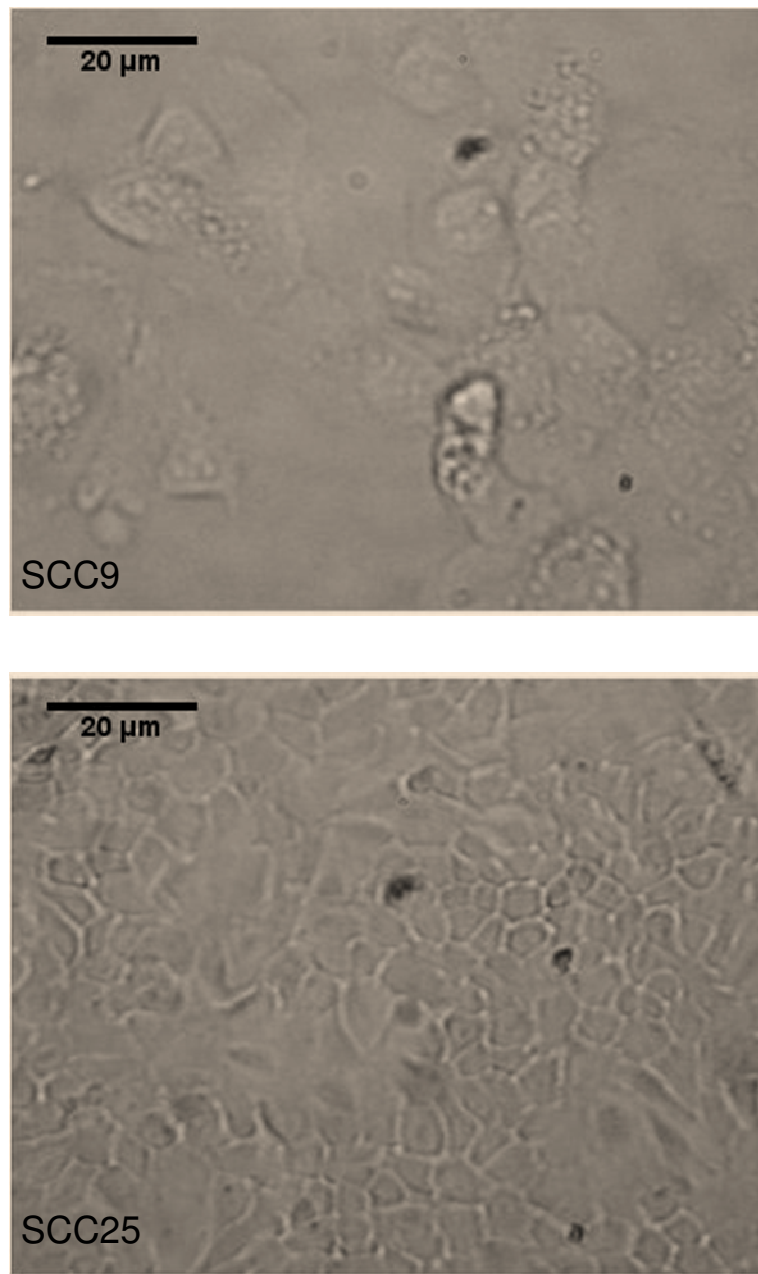
### **3 – Material e Métodos**

#### **3.1. Cultura Celular**

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas as linhagens imortalizadas de carcinoma epidermóide SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior do Departamento de Estomatologia/Patologia da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo-SP, Brasil, sendo as mesmas procedentes da ATCC (American Type Culture Collection). Essas linhagens são provenientes de carcinoma epidermóide de língua de indivíduos adultos do sexo masculino com idades de 55, 25, 55 e 70 anos, respectivamente (RHEINWALD; BECKETT, 1981).

As linhagens foram incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> em meio DMEM-HAM F12 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) e 400 µm hidro cortisona (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

A Figura 3 mostra as células SCC9 e SCC25 em cultivo. As células da linhagem SCC4 e SCC15 apresentaram um cultivo celular abaixo do esperado e dessa forma, não foi possível a sua utilização nos demais experimentos para avaliação da viabilidade celular e expressão gênica e proteica. Com isso, os experimentos se seguiram com as linhagens SCC9 e SCC25.



**Figura 3.** Linhagens de carcinoma epidermóide oral selecionadas para o estudo: SCC9 e SCC25.

### 3.2. Tratamento de células *in vitro*

Para a avaliação dos genes *HIF-1 $\alpha$*  e *VEGF*, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (EasyPath) contendo  $0,05 \times 10^6$  células/poço, e divididos em:

- Grupo I - Controle (não tratado)
- Grupo II - Hipóxia (100  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$ )
- Grupo III - Hipóxia + tratamento com melatonina em diferentes concentrações (0,5, 1, 2, 5 mM)
- Grupo IV - tratado apenas com diferentes concentrações de melatonina (0,5, 1, 2, 5 mM) durante 24 h (DAI et al., 2008).

Para a avaliação do gene *ROCK1*, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (EasyPath) contendo  $0,05 \times 10^6$  células/poço, e divididos em:

- Grupo I - Controle (não tratado)
- Grupo II - tratado apenas com diferentes concentrações de melatonina (0,5, 1, 2, 5 mM) durante 24 h (DAI et al., 2008).

### 3.3. Teste de viabilidade celular pelo Ensaio MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

Inicialmente, o meio de cultura e os tratamentos foram descartados e 100  $\mu$ L de meio de cultura foram adicionados em cada poço. Subsequentemente, 10  $\mu$ L de solução MTT à 12 mM de Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen Life Technologies) foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada durante 4 h a 37°C. O meio de cultura foi rejeitado e os cristais de formazan dissolvido em 50  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

A placa foi novamente incubada a 37°C durante 10 min e as amostras foram misturadas antes da leitura da absorvância medida pelo leitor ELISA (Thermo Plate) sob comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular (%)



de todos os grupos foi calculada a partir dos valores médios de absorvância em triplicata, o grupo controle sendo tomado como 100%. Nos grupos tratados, o resultado foi calculado a partir da diferença em relação ao grupo de controle.

### 3.4. qRT-PCR quantitativa (qPCR)

O RNA total foi extraído a partir da cultura de células pelo método TRIZOL (Invitrogen Life Technologies® - São Paulo, Brasil), e a fita de cDNA foi sintetizada utilizando o Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) em um volume total de 20 µL das misturas da reação na concentração final de 100 ng/µL.

A expressão quantitativa foi realizada por meio de qRT-PCR em triplicata utilizando o Sistema Step one Plus (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) e um controle negativo foi incluído em cada reação. As reações de PCR continham 100 ng de cDNA, 10 mL TaqMan Universal Master Mix, 8 mL de solução de água DEPC, 1 mL TaqMan Gene Expression para *VEGF*, *HIF-1α*, *HPRT1* e *RPLPO*, que foram submetidos ao seguinte esquema de amplificação: 50 ° C durante 2 min, 95 ° C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 min.

Cada nível de transcrição foi normalizado pelos genes *HPRT1* e *RPLPO* usados como controle interno de expressão. Para a análise da expressão dos genes, foram utilizados os ensaios TaqMan (Applied Biosystems®): *HIF-1α* (Hs00153153\_m1), *VEGF* (Hs00900055\_m1), *ROCK-1* (Hs01127699\_m1), *HPRT1* (Hs01003267\_m1) e *RPLPO* (Hs04189669\_m1).

A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo  $\Delta\Delta C_t$ , que relaciona a média da expressão dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno e a média da expressão dos genes de interesse em cada amostra (LIVAK & SCHMITTGEN, 2008).

O valor de RQ (quantificação relativa) do grupo controle (utilizado como referência) foi estabelecido como unidade para a análise da expressão dos genes *HIF-1α*, *VEGF* e *ROCK-1*.

### 3.5. Análise imunocitoquímica

As células em cultivo foram transferidas para uma lâmina com garrafa acoplada (Thermo Fisher Scientific, NY, EUA), incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Após retirou-se o meio de cultura e realizou a lavagem das células com PBS, a garrafa foi incubada com 1 mL de formaldeído 4% por 20 min., logo em seguida as garrafas foram desacopladas da lâminas e incubadas com 10% de peróxido de hidrogênio por 30 min. para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi feita em uma panela de pressão (ARNO, São Paulo, SP, Brasil) a 95°C com tampão citrato (pH 6) por 30 min. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com uma solução de albumina bovina (BSA) durante 30 min. e incubou-se a 4°C durante a noite com os anticorpos descritos anteriormente. Posteriormente, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 15 min. e incubadas com o Starr TREK Universal HRP Kit de Detecção (Médico Biocare, Concord, CA, EUA), que consistiu do anticorpo secundário biotinilado antirato, CEBIho e imunoglobulinas de cabra durante 20 min. e complexo estreptoavidina-peroxidase durante 10 min., seguido por lavagem com PBS durante 15 min. Foram aplicados 0,5% tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB ® Signet Laboratories, Dedham, MA, EUA) para as lâminas de 2-5 min. a 20-22 ° C. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 40 s.

Foram realizadas tomadas fotográficas de 3 campos em cada lâmina. As lâminas foram fotografadas e as proteínas quantificadas pelo software ImageJ na lente objetiva 40 x de microscópio Nikon Eclipse E200. Para cada lâmina foram tiradas 3 fotos, marcando 20 pontos em cada, totalizando 60 pontos para o calculo da média da intensidade relativa da imunorreatividade. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (UA) e a densidade óptica média (DOM) revelou à intensidade da coloração nas áreas especificamente imunorreativos.

As linhagens foram separadas em grupos de acordo com os tratamentos realizados (grupo I - controle, grupo II - hipóxia, grupo III - hipóxia+melatonina e

grupo IV - melatonina para os genes *VEGF* e *HIF-1  $\alpha$* , e grupo I - controle, grupo II – melatonina para o gene *ROCK1*).

### 3.6. Análise Estatística

Primeiramente, os resultados foram submetidos à análise de distribuição normal usando Column statistics and Gaussian distribution test. Em seguida, as médias da análise densitométrica e o valor de RQ referente à expressão dos genes *VEGF* e *HIF-1 $\alpha$*  foram comparadas nos diferentes grupos utilizando o teste ANOVA, seguido de Bonferroni. Para avaliação da expressão do gene *ROCK1*, foi utilizado o teste *t*. Para a técnica de PCR em Tempo Real, o valor de RQ (quantificação relativa) do grupo controle (utilizado como referência) foi estabelecido como unidade para a análise da expressão dos genes *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* e *ROCK-1*.

Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (SD). Valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

#### 4 – Resultados e Discussão

Os resultados e a discussão foram escritos na forma de artigo científico, o qual foi submetido para publicação no *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*.

*Article title: Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin*

MS ID : 8780917561091575

Authors : Rodrigo Ventura Rodrigues, Naiane Nascimento Gonçalves, Bruna Victorasso Jardim-Perassi, Marina Gobbe Moschetta, Juliana Ramos Lopes, Jucimara Colombo and Debora Zuccari

Journal : Journal of Experimental & Clinical Cancer Research

Dear Dr Zuccari

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author. A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file. We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within six weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on [editorial@jeccr.com](mailto:editorial@jeccr.com). We would also welcome feedback about the online submission process, which can be sent to [info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com).

Best wishes,

The Journal of Experimental & Clinical Cancer Research Editorial Team

e-mail: [editorial@jeccr.com](mailto:editorial@jeccr.com)

Web: <http://www.jeccr.com/>

## MOLECULAR MARKERS OF ANGIOGENESIS AND METASTASIS IN LINES OF ORAL CARCINOMA AFTER TREATMENT WITH MELATONIN

Rodrigo Ventura Rodrigues <sup>1,2 †</sup> [rodrigovrodrigues@yahoo.com.br](mailto:rodrigovrodrigues@yahoo.com.br)

Naiane do Nascimento Gonçalves <sup>2,3 †</sup> [naiane\\_rp@yahoo.com.br](mailto:naiane_rp@yahoo.com.br)

Bruna Victorasso Jardim Perassi <sup>1,2</sup> [brunavj@hotmail.com](mailto:brunavj@hotmail.com)

Marina Gobbe Moschetta <sup>2,3</sup> [mary\\_na15@hotmail.com](mailto:mary_na15@hotmail.com)

Juliana Ramos Lopes <sup>1,2</sup> [jurlp@hotmail.com](mailto:jurlp@hotmail.com)

Jucimara Colombo <sup>2</sup> [jucimaracolombo@yahoo.com.br](mailto:jucimaracolombo@yahoo.com.br)

Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari <sup>2, 4 \*</sup> [debora.zuccari@famerp.br](mailto:debora.zuccari@famerp.br)

<sup>1</sup> PostGraduate Program in Genetics, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC), Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>3</sup> PostGraduate Program in Health Sciences, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Molecular Biology – FAMERP and Collaborator Professor in Program of Post-Graduate in Genetics - UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

† These authors contributed equally

**\*Corresponding author:** Debora Ap. Pires de Campos Zuccari, PhD, Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC), Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP. Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil. Fax: +55-17-3201-5885.

## ABSTRACT

### Background

Oral cancer is the most common type of head and neck cancer and its high rate of mortality and morbidity is closely related to the processes of angiogenesis and tumor metastasis. The overexpression of pro-angiogenic genes, *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF*, and pro-metastatic gene, *ROCK-1*, are associated with unfavorable prognosis in oral carcinoma. Melatonin has oncostatic, antiangiogenic and antimetastatic properties in several types of neoplasms; its relationship with oral cancer is little explored, though. This study aims to analyze the expression of genes *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* in lines of squamous cell carcinoma of tongue, after treatment with melatonin.

### Methods

SCC9 and SCC25 cells were cultured and cell viability was assessed by MTT assay, after treatment with 100 $\mu$ M of CoCl<sub>2</sub> for induction of hypoxia and with melatonin at different concentrations. The analysis of quantitative RT-PCR and the immunocytochemical analysis were performed to verify the action of melatonin under conditions of normoxia and hypoxia, on gene and protein expression of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1*.

### Results

The MTT assay evidenced a decrease in cell viability in both cell lines, after the treatment with melatonin. The analysis of quantitative RT-PCR evidenced an inhibition of the expression of pro-angiogenic genes *HIF-1 $\alpha$*  ( $P < 0.001$ ) and *VEGF* ( $P < 0.001$ ) under conditions of hypoxia, and of pro-metastatic gene *ROCK-1* ( $P < 0.0001$ ) in the cell line SCC9, after treatment with 1 mM of melatonin. The immunocytochemical analysis evidenced a positive correlation with gene expression data, validating the results of quantitative RT-PCR of line SCC9. Treatment with melatonin did not demonstrate inhibition of the expression of genes *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* in line SCC25, which has different molecular characteristics and greater degree of malignancy when compared to the line SCC9.

### Conclusion

Melatonin affects cell viability in the lines SCC9 and SCC25 and inhibits the expression of genes *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* in line SCC9. Additional



studies may confirm the potential therapeutic effect of melatonin in some subtypes of oral carcinoma.

**KEYWORD:** oral cancer, cell lines, *VEGF*, *HIF-1 $\alpha$* , *ROCK-1*, melatonin.

## BACKGROUND

Oral cancer is the most common type of cancer of head and neck cancer, with a global annual incidence of approximately 300,000 new cases, and is more prevalent in men [1]. The use of tobacco and/or alcohol are the main risk factors involved in its development. Other factors include poor oral hygiene, nutritional deficiencies and infections caused by human papillomavirus (HPV), particularly HPV of types 16 and 18 [2,3].

Despite the advances in therapeutic approaches, the survival rate of 5 years of oral squamous cell carcinoma, also called epidermoid oral carcinoma, remains around 50% [4]. The oral carcinoma is a locally aggressive tumor which features large areas of necrosis in which hypoxia levels are too high, leading to development of drug resistance and poor response to chemotherapy [5].

Hypoxia is a common characteristic of the tumor microenvironment and regulates a variety of transcriptional factors with emphasis on the factor induced by hypoxia (*HIF1- $\alpha$* ). The overexpression of *HIF1- $\alpha$*  increases tumor angiogenesis by inducing the overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor (*VEGF*) and other angiogenic factors which lead to a more aggressive tumor phenotype and resistance to radiotherapy and chemotherapy [6]. Thus, studies have shown that the overexpression of *HIF-1 $\alpha$*  [7,8] and *VEGF* [9,10] is related to tumor progression and unfavorable prognosis in oral carcinoma.

The local invasion and metastasis in cervical lymph nodes and, later, to other organs, such as lung, bones and liver, are also frequent events in oral carcinoma and contribute to its poor prognosis [11]. The kinase proteins associated with Rho 1 and 2 (*ROCK-1* and *ROCK-2*) belong to a family of serine/threonine kinases, which are effectors of Rho GTPases A, B and C [12,13]. The model Rho/*ROCK-1* is one of main regulators of the actin cytoskeleton and its deregulation is associated with an increase in invasibility and motility of neoplastic cells, contributing to the metastatic behavior of some types of tumors and pancreatic cancer [14], bladder cancer [15], breast cancer

[16] and lung cancer [17]. Studies have evidenced that overexpression of protein ROCK in tumor tissue is associated with poor prognosis and reduction of patients' survival with breast cancer [18,19].

Once the oral carcinoma presents a high rate of mortality and morbidity, there is a growing interest in the identification of new therapeutic agents which can interact with specific molecular markers, mainly related to angiogenesis and metastasis, inhibiting tumor progression.

Melatonin, a hormone which is naturally produced and secreted in the pineal gland, has shown effective to tumor inhibition, both in vivo studies and in vitro studies [20,21]. This hormone has oncostatic activity through a variety of mechanisms including antiproliferative actions, anticancer immunity stimulation, modulation of expression of oncogenes, antiinflammatory, antioxidant, antiangiogenic and antimetastatic effects [22].

In vitro studies have observed that melatonin inhibits the expression of HIF-1 $\alpha$  in cancer cells of prostate [23], of glioblastoma [24], as well as VEGF expression in cancer cells of breast [25], of pancreas [26], of liver [27] and of glioblastoma [28]. In addition, some studies have demonstrated that melatonin inhibits the migration process and invasion in lines of canine kidney and in breast cancer cells via ROCK-1 protein [28,29].

In relation to oral cavity, melatonin seems to play a protective role with respect to tissue damage caused by oxidative stress. Studies have shown that this hormone has a beneficial effect in certain oral diseases including periodontitis, infection by herpes virus, candidiasis, xerostomia, oral ulcers and precancerous lesions [30]. However, there are no studies which correlate the action of melatonin with expression of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* in oral cancer.

Since angiogenesis and metastasis are two fundamental processes in tumor progression and are related to patients' prognosis and survival, this study aimed to evaluate the expression of pro-angiogenic genes *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* and of pro-metastatic gene *ROCK-1* in lines of oral squamous cell carcinoma, after treatment with melatonin.

## METHODS

### Cell Culture

In order to develop this study, the lines of squamous cell carcinoma of tongue SCC25 and SCC9 were used, which were kindly provided by Professor. Dr. Decio Santos Pinto Junior from Department of Stomatology/ Pathology), College of Dentistry, USP, São Paulo (SP), Brazil), and came from ATCC (American Type Culture Collection). The immortalized lines of SCC9 and SCC25 were derived from squamous cell carcinoma of the tongue of adult males with ages of 25 and 70 years old, respectively [31].

The lines were incubated at 37°C in 5% of CO<sub>2</sub> in DMEM-HAM F12 (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), supplemented with 10% of fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil) and 400 µL of hydrocortisone (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil).

### Treatment of cells in vitro

Cells were plated in plates of 96 wells (EasyPath) containing 0.05x10<sup>6</sup> cells/well and were divided into: control group (untreated), hypoxia group (100 µM of CoCl<sub>2</sub>), hypoxia group + treatment with melatonin at different concentrations (0.5, 1, 2, 5 mM) and group treated with different concentrations of melatonin (0.5, 1, 2, 5 mM) for 24 h [32].

### Test of cell viability by MTT Assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)

After the period of treatment with cobalt chloride and melatonin, the culture medium was discarded and 100 µL of fresh medium was added to each well. Subsequently, 10 µL of MTT solution at 12 mM of Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen Life Technologies) was added to each well and the plate was incubated for 4 hours at 37°C. The culture medium was discarded and the formazan crystals were dissolved in 50 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil).

The plate was incubated at 37°C for 10 minutes and the samples were homogenized before reading of absorbance measured by ELISA reader (Thermo Plate) under the a wavelength of 540 nm. Cell viability (%) of all groups was calculated from the average values of absorbance in triplicate, when the control group was taken as 100%. In the treated groups, the result was calculated from the difference compared to the control group.

### Quantitative RT-PCR (qPCR)

Total RNA was extracted from the cell culture through the method TRIZOL (Invitrogen Life Technologies® - Sao Paulo, Brazil), and the tape of cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) in a total volume of 20 µL of reaction mixtures at final concentration of 100 ng/µL.

The quantitative expression was performed through RT-PCR in triplicate, using the Step One Plus System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), and a negative control was included in each reaction. PCR reactions contained 100 ng of cDNA, 10 mL of TaqMan Universal Master Mix, 8 mL of DEPC solution of water, 1 mL of TaqMan Gene Expression for HIF-1 $\alpha$ , VEGF, ROCK1, HPRT1 and RPLPO, which were submitted to the following scheme amplification: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 203°F (95°C) for 15 s and 60°C for 1 min.

The levels of transcription of genes of interest, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, ROCK1, were normalized by *HPRT1* and *RPLPO* genes, used as internal control of expression. For the analysis of gene expression, the TaqMan assays (Applied Biosystems ®) were used: *HIF-1 $\alpha$*  (Hs00153153\_m1), *VEGF* (Hs00900055\_m1), *ROCK-1* (Hs01127699\_m1), *HPRT1* (Hs01003267\_m1) and *RPLPO* genes (Hs04189669\_m1).

The relative expression of the genes of interest was determined by the comparative method  $\Delta\Delta C_t$ , which relates the average of expression of normalizer genes used as endogenous control and the average of expression of genes of interest in each sample (Livak; Schmittgen, 2008).

The value of RQ (Relative Quantification) of the control group (used as reference) was established as the unit for analysis of the expression of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* genes.

### **Immunocytochemistry**

For immunocytochemistry technique,  $0.5 \times 10^6$  cells in culture were transferred to a slide with coupled bottle (Thermo FisherScientific, NY, USA) and incubated at 37°C for 24 hours. After this period, the culture medium was removed and washing the cells with PBS was performed. For fixing the cells, the bottle was incubated with 1 mL of 4% formaldehyde for 20 minutes.

Soon afterwards, the bottles were decoupled from the slides and incubated with 10% of hydrogen peroxide for 30 minutes to block endogenous peroxidase. Antigen retrieval was performed in a pressure cooker (ARNO, São Paulo, SP, Brazil) at 95°C with citrate buffer (pH 6) for 30 minutes. After cooling, the slides were covered with a solution of bovine albumin (BSA) and incubated for 30 minutes at (4° C) overnight with antibodies for HIF-1 $\alpha$ , VEGF and ROCK1 proteins. Subsequently, they were washed with buffered saline solution (PBS) with phosphate for 15 minutes and incubated for with the Starr TREK Universal HRP Detection Kit (Medical Biocare, Concord, CA, USA), which consisted of biotinylated secondary antibody anti-mouse, anti-rabbit and anti-goat immunoglobulins for 20 min and streptavidin-peroxidase complex for 10 minutes, followed by washing with PBS for 15 min. 0.5% tetracloridrate of 3,3-diaminobenzidine (DAB ® Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) was applied for 2-5 min slides at 68-71.6° F (20-22° C). The slides were contrasted with Harris hematoxylin for 40 s.

### **Evaluation of immunocytochemical staining by optical densitometry**

Various fields were examined on each slide, especially the areas delimited with brown staining. The slides were photographed, and proteins were quantified by ImageJ software in the objective lens 40 x of Nikon Eclipse E200 microscope. For each slide, 3 photos were taken, scoring 20 points in each, totaling 60 points for the calculation of the average relative intensity of immunoreactivity. The values were obtained as Arbitrary Units (AU), and the Mean Optical Density (MOD) revealed the intensity of staining in specifically immunoreactive areas.

### **Statistical Analysis**

The lines were separated into groups, according to the treatments performed (group I – control; group II – hypoxia; group III – hypoxia + melatonin; and group IV – melatonin). First, the results were submitted to analysis of normal distribution using Column statistics and Gaussian distribution test. The averages of optical densitometric analysis and RQ value related to the expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  genes were compared in different groups, using ANOVA test, followed by Bonferroni test. For the analysis of ROCK, was used the test *t*. For the technique of quantitative RT-PCR, the value of RQ (Relative Quantification) of control group (used as reference) was established as a unit for the analysis of expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and ROCK-1 genes.

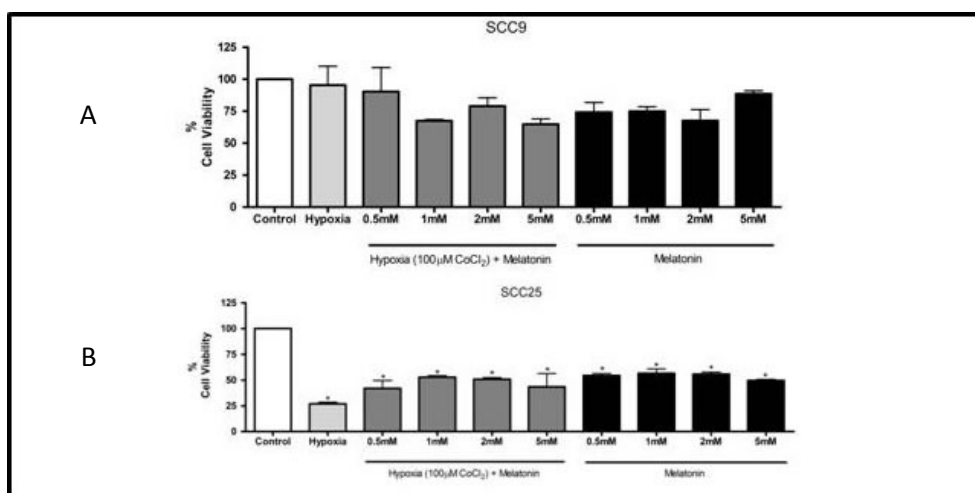
All values were expressed as the average  $\pm$  Standard Deviation (SD). The value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All analyzes were performed using GraphPad PRISM4 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

## RESULTS

### Test of cell viability by MTT assay

The number of viable cells was estimated by MTT assay, after treatment with CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) and/or melatonin (0.5, 1, 2, 5 mM) for 24 h. For cells of line SCC9, the results showed that, for all groups, there was a reduction in cell viability, when compared to the control group; however, there was no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) (Figure 1A).

For cells of line SCC25, the fact that the induction of hypoxia by CoCl<sub>2</sub> significantly reduced cell viability, when compared to the control group, was observed; ( $P < 0.001$ ) and the same was observed for the groups treated with different concentrations of melatonin in both hypoxic conditions as in normal conditions of oxygen ( $P < 0.001$ ; Figure 1B).



**Figure 1.** Analysis of cell viability by MTT assay in lines of oral carcinoma after treatment with CoCl<sub>2</sub> (100 μM) for induction of hypoxia and/or melatonin (0.5, 1, 2, 5mM). Data are expressed as the percentage of the control group. (A) Analysis of cell viability in the line SCC9. (B) Analysis of cell viability in the line SCC25.

\*  $P < 0.05$  statistically significant difference when compared to control

## Quantitative RT-PCR (qPCR)

### Line SCC9

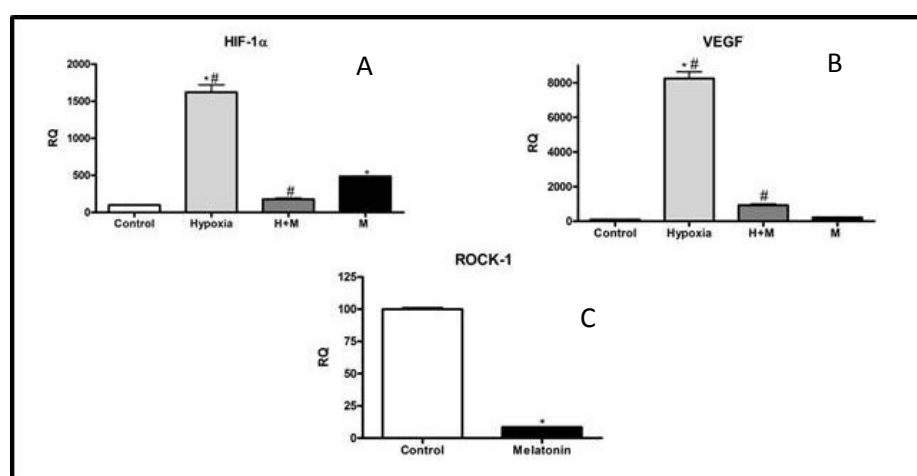
For the analysis of gene expression of *HIF-1α*, *VEGF* and *ROCK-1* in the line SCC9, the concentration of 100 μM of CoCl<sub>2</sub> for induction of hypoxia and 1 mM melatonin was used. This concentration of melatonin was chosen not only because it was the dose used in cell viability assays [32], but also because, among the concentrations tested for line SCC9, it was the one that caused the most significant reduction in cell viability, when compared to control group, although it was not statistically significant.

As expected, the cells under the hypoxia presented overexpression of *HIF-1α* compared to control cells ( $P < 0.001$ ); the same occurred with cells in normoxia treated with melatonin ( $P < 0.01$ ). However, cells treated with melatonin under the hypoxia showed subexpression of *HIF-1α* gene, when compared to cells under hypoxia ( $P < 0.001$ ) (Figure 2A).

The *VEGF* gene was overexpressed in cells under the hypoxia, when compared to control ( $P < 0.001$ ). The results also showed that treatment with melatonin did not significantly alter the expression of *VEGF* in this line, when

compared to the control group. However, just as observed for *HIF-1 $\alpha$*  gene, cells under the hypoxia treated with melatonin presented subexpression of *VEGF* gene, when compared to untreated cells under hypoxia ( $P < 0.001$ ) (Figure 2B).

For evaluation of *ROCK-1* gene, the cells were not submitted to 100  $\mu$ M of  $\text{CoCl}_2$ , since its expression is not dependent on conditions of hypoxia. Thus, *ROCK-1* gene was presented subexpressed in cells treated with melatonin, when compared to the control group ( $P < 0.0001$ ) (Figure 2C).



**Figure 2.** Analysis of gene expression of (A) *HIF-1 $\alpha$* , (B), *VEGF* and (C) *ROCK-1* in the line SCC9, after treatment with  $\text{CoCl}_2$  (100  $\mu$ M) for induction of hypoxia and/or melatonin (1 mM). Data are expressed as the percentage of the control group.

\*  $P < 0.05$  statistically significant difference when compared to control

#  $P < 0.05$  statistically significant difference between cells treated with  $\text{CoCl}_2$  for induction of hypoxia and cells treated with  $\text{CoCl}_2$  and melatonin

## Line SCC25

For the analysis of gene expression of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* in line SCC25, the concentration of 100  $\mu$ M of  $\text{CoCl}_2$  for induction of hypoxia and 0.5 mM of melatonin, selected to represent the lowest concentration of melatonin which caused a significant decrease in cell viability, was used.

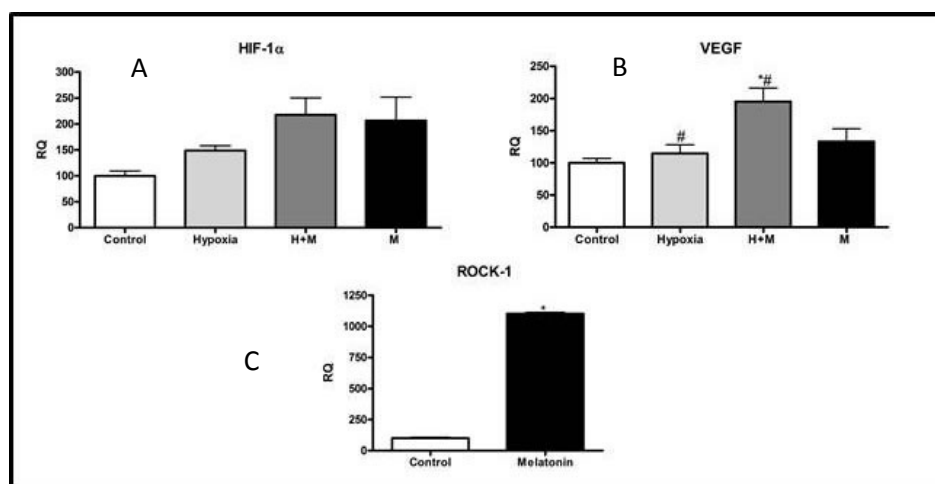
The *HIF-1 $\alpha$*  gene was not differentially expressed in treated groups, when compared to the control group ( $P > 0.05$ ) (Figure 3A).

The *VEGF* gene was overexpressed in the group – under the hypoxia – treated with melatonin, when compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Additionally, there was an increase of expression in cells under the hypoxia



treated with melatonin, when compared to untreated cells under hypoxia ( $P < 0.05$ ) (Figure 3B).

The *ROCK-1* gene was overexpressed in cells treated with melatonin, when compared to the control group. ( $P < 0.0001$ ) (Figure 3C).



**Figure 3.** Analysis of gene expression of (A) *HIF-1α*, (B) and *VEGF* (C) *ROCK-1* in the line SCC25, after treatment with  $\text{CoCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) for induction of hypoxia and/or melatonin (1 mM). Data are expressed as the percentage of the control group.

\*  $P < 0.05$  statistically significant difference when compared to control

#  $P < 0.05$  statistically significant difference between cells treated with  $\text{CoCl}_2$  for induction of hypoxia and cells treated with  $\text{CoCl}_2$  and melatonin

H+M = hypoxia and melatonin, M = melatonin

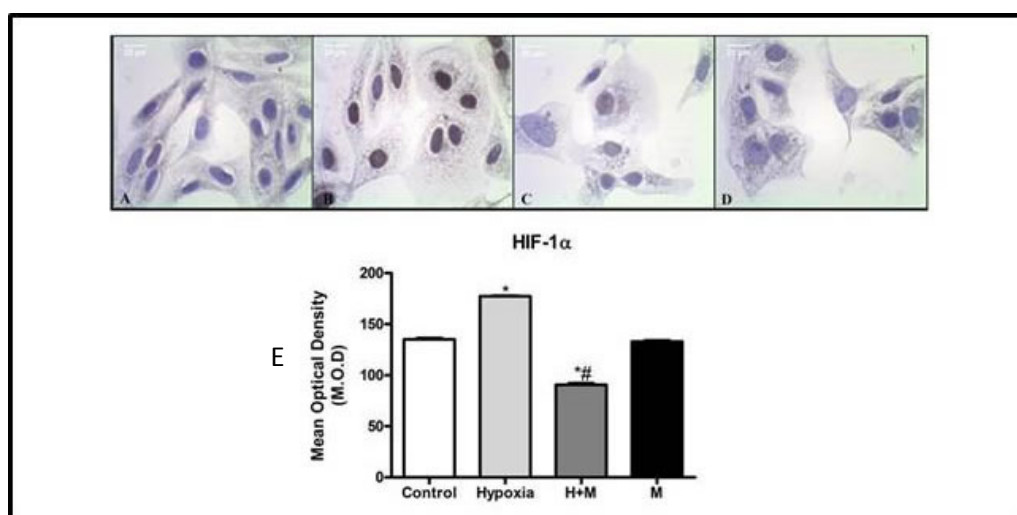
## Immunocytochemistry

Since there was a decrease in gene expression *HIF-1α*, *VEGF* and *ROCK-1* in response to treatment with melatonin in the line SCC9, the protein expression was assessed by immunocytochemistry, in order to validate the results obtained by the technique of quantitative RT-PCR.

## Line SCC9

For detection of the protein of *VEGF*, *HIF-1α* and *ROCK-1*, immunocytochemistry followed by quantification of immunostaining by optical densitometry was performed. The results were obtained in Arbitrary Units (AU) and demonstrated the value of the Mean Optical Density (MOD) + standard error.

In cells of line SCC9, there was an increase in immunostaining of HIF-1 $\alpha$  in cells under hypoxia, when compared to the control group ( $P < 0.001$ ). In cells under hypoxia treated with melatonin, there was a decrease in immunostaining of HIF-1 $\alpha$ , when compared to the control group ( $P < 0.001$ ). Moreover, the immunostaining of HIF-1 $\alpha$  was also lower in cells treated under hypoxia with melatonin, when compared to cells only under hypoxia ( $P < 0.001$ ) (Figure 4A-E).



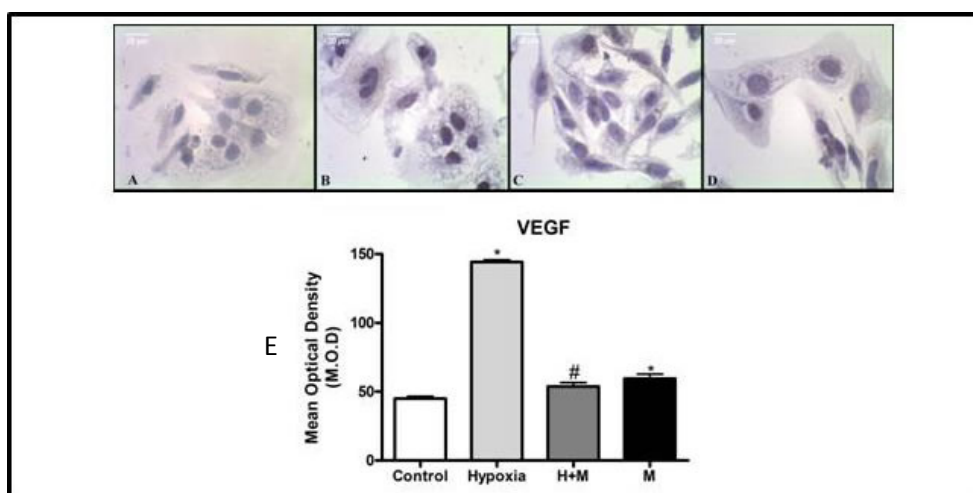
**Figure 4.** Immunocytochemistry of the protein HIF-1 $\alpha$ , showing SCC9 cells (40 x of magnitude) after 24 hours of treatment with CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) for induction of hypoxia and/or melatonin (1 mM). (A) Untreated Cells – control group. (B) Cells under hypoxia. (C) Cells under hypoxia treated with melatonin. (D) Cells only treated with melatonin. (E) Statistical analysis of protein expression of HIF-1 $\alpha$  in the study groups. Data are shown as average  $\pm$  Standard Deviation.

\*  $P < 0.05$  statistically significant difference when compared to control group

#  $P < 0.05$  a statistically significant difference between cells treated with CoCl<sub>2</sub> for induction of hypoxia and cells treated with CoCl<sub>2</sub> and melatonin

H + M = hypoxia and melatonin, M = melatonin M

As far as immunostaining of VEGF is concerned, there was a statistically significant increase in the group under hypoxia ( $P < 0.001$ ) and in the group treated with melatonin ( $P < 0.001$ ), when compared to control group. Just as observed for the protein HIF-1 $\alpha$ , there was a statistically significant reduction of immunostaining of VEGF in cells under hypoxia treated with melatonin, when compared to cells only under hypoxia ( $P < 0.001$ ) (Figure 5A-E).



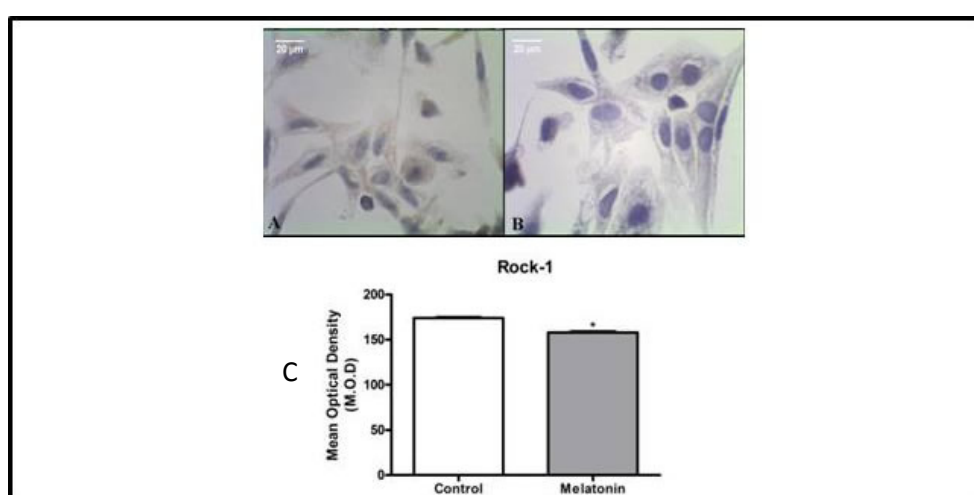
**Figure 5.** Immunocytochemistry of the protein VEGF, showing SCC9 cells (40 x of magnitude) after 24 hours of treatment with  $\text{CoCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) for induction of hypoxia and/or melatonin (1 mM). (A) Untreated Cells – control group. (B) Cells under hypoxia. (C) Cells under hypoxia treated with melatonin. (D) Cells only treated with melatonin. (E) Statistical analysis of protein expression of VEGF in the study groups. Data are shown as average  $\pm$  Standard Deviation.

\*  $P < 0,05$  statistically significant difference when compared to control group

#  $P < 0.05$  a statistically significant difference between cells treated with  $\text{CoCl}_2$  for induction of hypoxia and cells treated with  $\text{CoCl}_2$  and melatonin

H + M = hypoxia and melatonin, M = melatonin M

The immunostaining of ROCK-1 demonstrated a statistically significant decrease in cells treated with melatonin, when compared to control group ( $P < 0.001$ ) (Figure 6A-C).



**Figure 6.** Immunocytochemistry of the protein ROCK-1, showing SCC9 cells (40 x of magnitude) after 24 hours of treatment with melatonin (1 mM). (A) Untreated Cells – control

group. (B) Cells treated with melatonin (C) Statistical analysis of protein expression of ROCK1 in the study groups. Data are shown as average  $\pm$  Standard Deviation.

\*  $P < 0.05$  statistically significant difference when compared to control group

## DISCUSSION

Oral cancer is a locally aggressive tumor and its morbidity and mortality remains high, in spite of the employed therapeutic approaches. Thus, new treatment strategies are needed [33]. Several studies have shown that melatonin has antineoplastic properties in some cancers, such as breast cancer [34], liver cancer [27], pancreas cancer [35] and colon cancer [36], emerging as a new therapeutic option. However, the relationship of melatonin with oral cancer is still poorly explored [37].

Our main purpose was to evaluate the effects of treatment with melatonin on the expression of genes related to angiogenesis and metastasis in oral carcinoma cell lines, since these two processes are closely related to progression and prognosis. The immortalized lines of SCC9 and SCC25 were chosen because some studies have indicated that they have different degrees of malignancy [38,39]. Thus, carrying out studies that aim to check their different responses to the action of new drugs is particularly interesting.

In this work, the fact that melatonin decreased cell viability in lines SCC9 and SCC25 was observed; however, this reduction was more pronounced in the line SCC25. The inhibition of cell proliferation after treatment with melatonin has also been observed in other studies, using line of hepatocarcinoma [40], breast cancer [41] and gastric adenocarcinoma [42].

However, the exact mechanism through which melatonin inhibits cell growth in culture and in animal models is not fully understood, although some mechanisms have been proposed. These include induction of apoptosis, changes in the lipidic metabolism and an increase directly from the activity of natural killer cells, as well as stimulation of production of cytokines, such as interleukins IL-2, IL-6, IL-12 and IFN interfereron [43,44].

Thus, the action of melatonin in the line SCC25 may happen through a different mechanism that was not detected in this study, since our results

demonstrated that treatment with melatonin inhibited the gene expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and ROCK only in the line SCC9.

Some studies also have shown the antiangiogenic action of melatonin, through the decreasing of expression of *HIF-1 $\alpha$*  in colon cancer cells [45], in liver cancer cells [27] and glioma [24], as well as the decreasing of expression of *VEGF* in breast cancer cells [25], pancreas cancer cells [26] and liver cancer cells [27]. Lissoni et al. [46] have shown that treatment with melatonin (20mg/day) in patients with various types of metastatic cancer reduced the plasma concentration of VEGF in patients who did not have tumor progression after two months of treatment, concluding that melatonin can be considered an antioangiogenic molecule.

Our results showed that, in the line SCC9, melatonin treatment in normoxic conditions did not inhibit the expression of pro-angiogenic genes *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF*, when compared with the control group. However, the expression of *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* was statistically lower in cells under hypoxia treated with melatonin, when compared with cells under hypoxia which were not treated with melatonin. Carbajo-Pescador et al. [27] and Park et al. [45] observed similar results in line of hepatocarcinoma and colon cancer, respectively, demonstrating that the effects of melatonin treatment on the expression of *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* are mainly seen in conditions of hypoxia. It is important to note that data of immunocytochemistry corroborated the quantitative analysis of RT-PCR, showing a decrease in the expression of HIF-1 $\alpha$  protein and VEGF, in cells under hypoxia treated with melatonin, when compared to cells only under hypoxia.

This is probably due to the fact that cell normoxia leads to ubiquitination of HIF-1 $\alpha$  and subsequent proteasomal degradation. Nevertheless, under conditions of hypoxia, HIF-1 $\alpha$  is stabilized, being able to translocate to the nucleus and induce the expression of multiple genes, such as *VEGF*. In addition, although *VEGF* expression can be directed by growth factors and interleukins, hypoxia and, consequently, the expression of *HIF-1 $\alpha$*  seem to be the principal regulator of its production [47]. Thus, our results suggest that melatonin has anti-angiogenic activity by inhibiting the stabilization of HIF-1 $\alpha$  under hypoxic conditions.

The decrease in the expression of *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* genes by melatonin in hypoxic conditions, observed in this study in the line SCC9, is of particular interest, since the oral carcinoma is characterized by very high levels of hypoxia, which contributes for its low response to chemotherapy [5]. In addition, high expression of *HIF-1 $\alpha$*  [7,8] and of *VEGF* [9,10] is related to unfavorable prognostic features, such as larger tumor size and reduced survival in patients with oral cancer.

Regarding the *ROCK-1* gene, a decrease of its expression in cells treated with melatonin in the line SCC9 was observed, when compared to untreated cells. The Rho/ROCK-1 signaling model is a key regulator of cell motility, and the ability of neoplastic cells to invade and migrate is a prerequisite for tumor metastasis [13]. The overexpression of ROCK-1 proteins in tumor tissue is associated with metastasis, poor prognosis and reduced survival in patients with cancer, especially breast cancer [7,18]. On the other hand, inhibitors of the Rho/ROCK-1 model appear to reduce cell motility and, consequently, the development of metastasis [48,49].

Thus, the Rho/ROCK-1 model has been target for new therapeutic approaches in prostate cancer [50], glioma [51], melanoma [48], osteosarcoma [52] and lung cancer [53] with positive results in vitro models. Saito et al. [54] evidenced that the negative regulation of *ROCK-1* by micro RNA is associated with the growth inhibition and with survival of cell lines of oral cancer.

However, few studies have studied the relationship of melatonin with Rho/ROCK-1 model in cancer. A study performed by Ortiz-Lopez et al. [29] demonstrated that melatonin enhances cell adhesion and presents an inhibitory effect on the activity of ROCK-1, directly interfering in migration capacity of breast neoplastic cells.

Until now, there are no studies that have investigated this relationship in oral carcinoma, and this is the first study that demonstrated a positive effect of melatonin in the reduction of the expressions of the gene *ROCK-1* in the line SCC9. Furthermore, as observed for *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* genes, the immunocytochemical technique corroborated the analysis of quantitative RT-PCR, which confirms the decrease of gene and proteic expression of ROCK-1 on cells SCC9 treated with melatonin.

Unlike observed in the line SCC9, inhibitory action of melatonin in the expression of genes *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF* and *ROCK-1* in line SCC25 was not observed. This adverse effect may be due to the fact that line SCC25 presenting a more aggressive behavior, when compared to the line SCC9. According to Agostini et al. [38], the line SCC25 has a proliferative and mitotic rate greater than other lines of oral carcinoma, such as SCC4, SCC15 and SCC9. Furthermore, the authors observed a higher expression of EGF protein in line SCC25, when compared to the others, suggesting an autocrine induction of cell growth. Lopez de Cicco et al. [39], in turn, noted that the line SCC9, which is derived from well differentiated oral carcinoma, presents a degree of malignancy smaller, when compared to SCC15 and SCC71 lines, and, according to these authors, the degree of malignancy is positively correlated with the ability of VEGF production.

It is worth highlighting that there is evidence that the antineoplastic effects of melatonin are dependent on its receptor (MTNR1A), suggesting that it mediates effects on gene expression and on growth inhibition induced by this hormone [55]. The expression of *MTNR1* is observed in cell lines derived from normal oral cells, but could be silenced in oral carcinoma cell lines [37]. A study by Nakamura et al. [56] showed that the *MTNR1A* gene is often deleted in oral carcinoma cells or presents hypermethylation of the promoter region. The study also showed that the absence of immunoreactivity of MTNR1A was significantly associated with larger tumor size and shorter patients' survival.

The authors still found that the restoration of the exogenous of *MTNR1A* inhibited the growth of oral carcinoma cells where their expression was absent (Nakamura et al., 2008). Similarly, in a study conducted by Jabloska et al. [57] about breast cancer, the fact that high expression of *MTNR1A* gene was correlated with a higher rate of patients' survival was observed. Thus, another hypothesis for the adverse response of line SCC25, after treatment with melatonin, is that the degree of malignancy of the line is negatively correlated with receptor expression *MTNR1A*, as observed in clinical samples of oral cancer and breast cancer [56,57].

In conclusion, our study demonstrates that melatonin treatment is capable of inhibiting the expression of pro-angiogenic genes *HIF-1 $\alpha$*  and *VEGF* under hypoxic conditions, as well as gene expression of pro-metastatic gene

*ROCK-1* in the line SCC9. However, the same was not observed in line SCC25, possibly due to its more aggressive character. Studies using primary culture of oral carcinoma with different degrees of malignancy could corroborate melatonin as a therapeutic option for some subtypes of oral cancer, especially the less aggressive ones.

## ABBREVIATIONS

*HIF-1 $\alpha$* , Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha; *VEGF*, Vascular Endothelial Growth Factor; *ROCK*, Rho-kinase; SCC9; SCC25; MTT, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

## ACKNOWLEDGMENT

The study was made possible by financial support received from FAPESP.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

RVR and DAPCZ conceived the study, designed the experiments and drafted the manuscript. NNG carried out the in vitro experiments, the qPCR and the immunohistochemical. BVJ helped with the production of the manuscript. MGM helped in qPCR analysis and the immunohistochemical statistical analysis. JRL helped in vitro experiments. JC assisted in the analyses of data and with the production of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.



## REFERENCES

1. Kademani D: **Oral cancer**. *Mayo Clin Proc* 2007, **82**:878-887.
2. Zhao D, Xu QG, Chen XM, Fan MW: **Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer**. *Int J Oral Sci* 2009, **3**:119-125.
3. Lambert R, Sauvaget CCCM, Sankaranarayanan R: **Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx**. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011, **23**:633-641.
4. Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB: **Head and neck cancer: past, present and future**. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006, **6**:1111–1118.
5. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM., Pilar GD, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM., García-García A: **Hypoxia-inducible factors in OSCC**. *Cancer Lett* 2011, **26**:1-8.
6. Kang FW, Que L, Wu M, Wang ZL, Sun J: **Effects of trichostatin A on HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma cells in vitro**. *Oncol Rep* 2012, **28**:193-199.
7. Liu SY, Chang LC, Pan LF., Hung YJ, Lee CH, Shieh YS: **Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma**. *Oral Oncol* 2008, **44**:277-285.
8. Eckert AW, Kappler M, Schubert J, Taubert H: **Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients**. *Oral Maxillofac Surg* 2012, **16**:189-196.
9. Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, Mizuno A, Umeda M: **Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 $\alpha$  pathway**. *Anticancer Res* 2011, **12**:4429-4437.
10. Zhao SF, Yang XD, Lu MX., Sun GW, Wang YX, Zhang YK, Pu YM, Tang EY: **Prognostic significance of VEGF immunohistochemical**

- expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature.** *Tumour Biol* 2013, in press.
11. Islam M, Sharma S, Kumar B, Teknos TN: **Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis.** *Oral Oncol* 2013, **8**:778-786.
  12. Shi J, Wei L: **Rho kinase in the regulation of cell death and survival.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007, **55**:61-75.
  13. Patel RA, Liu Y, Wang B, Li R, Sebti SM: **Identification of novel ROCK-1 inhibitors with anti-migratory and anti-invasive activities.** *Oncogene*, 2013, in press.
  14. Kaneko K, Satoh K, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T: Expression of ROCK-1-1 in human pancreatic cancer: its down-regulation by morpholino oligo antisense can reduce the migration of pancreatic cancer cells in vitro. *Pancreas* 2002, **24**:251-257.
  15. Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H: **Significant association of Rho/ROCK-1 pathway with invasion and metastasis of bladder cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:2632-2641.
  16. Raviraj V, Fok S, Zhao J, Chien HY, Lyons JG, Thompson EW, Soon L: **Regulation of ROCK-11 via Notch1 during breast cancer cell migration into dense matrices.** *BMC Cell Biol* 2012, **13**:12.
  17. Vigil D, Kim TY, Plachco A, Garton AJ, Castaldo L, Pachter JA, Dong H, Chen X, Tokar B, Campbell SL, Der CJ: ROCK-1 and ROCK-2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion. *Cancer Res* 2012, **72**:5338-5347.
  18. Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG: **The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer.** *Int J Oncol* 2008, **33**:585-593.
  19. Liu S, Goldstein RH, Scepansky EM, Rosenblatt M: **Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone.** *Cancer Res* 2009, **69**:8742-8751.

20. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F: **Melatonin signaling and cell protection function.** *Faseb J* 2010, **24**:3603-3624.
21. Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, DE VJ, DE D RG: **Role of melatonin in cancer treatment.** *Anticancer Res* 2012, **32**:2747-2753.
22. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L: Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* 2013, **24**:2410-2430.
23. Park JW, Hwang MS, Suh SI, Baek WK: **Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells.** *J Pineal Res* 2009, **46**:415-21.
24. Zhang Y, Liu Q, Wang F, Ling EA, Liu S, Wang L, Yang Y, Yao L, Chen X, Wang F, Shi W, Gao M, Hao A: **Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 $\alpha$ .** *J Pineal Res* 2013, **55**:121-130.
25. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S: **Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells.** *J Pineal Res* 2013, **54**:373-380.
26. Lv D, Cui PL, Yao SW, Xu YQ, Yang ZX: **Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells.** *Chin J Cancer Res* 2012, **24**:310-316.
27. Carbajo-Pescador S, Ordoñez R, Benet M, Jover R, García-Palomo A, Mauriz JL, González-Gallego J: **Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells.** *Br J Cancer* 2013, **1**:83-91.
28. Ramírez-Rodríguez G, Ortiz-López L, Benítez-King G: Melatonin increases stress fibers and focal adhesions in MDCK cells: participation of Rho-associated kinase and protein kinase C. *J Pineal Res* 2007, **42**:180-190.
29. Ortiz-López L, Morales-Mulia S, Ramírez-Rodríguez G, Benítez-King G: **ROCK-1 regulated cytoskeletal dynamics participate in the**

- inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration.** *J Pineal Res* 2009, **46**:15-21.
30. Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ: **Melatonin in diseases of the oral cavity.** *Oral Dis* 2010, **16**:242-247.
31. Rheinwald JG, Beckett MA: **Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas.** *Cancer Res* 1981, **41**:1657-1663.
32. Dai M, Cui P, Yu M: **Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells.** *J Pineal Res* 2008, **44**:121-126.
33. George J, Narang RS, Rao NN: **Stromal response in different histological grades of oral squamous cell carcinoma: a histochemical study.** *Indian J Dent Res* 2012, **23**:842.
34. Jung JH, Sohn EJ., Shin EA, Lee D, Kim B, Jung DB, Kim JH, Yun M, Lee HJ, Park Y K, Kim SH: **Melatonin Suppresses the Expression of 45S Preribosomal RNA and Upstream Binding Factor and Enhances the Antitumor Activity of Puromycin in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, **2013**:1-8
35. Ruiz-Rabelo J, Vázquez R, Arjona A, Perea D, Montilla P, Túnez I, Muntané J, Padillo J: Improvement of capecitabine antitumoral activity by melatonin in pancreatic cancer. *Pancreas* 2011, **40**:410-414.
36. Wang J, Guo W, Chen W, Yu W, Tian Y, Fu L, Shi D, Tong B, Xiao X, Huang W, Deng W: **Melatonin potentiates the antiproliferative and pro-apoptotic effects of ursolic acid in colon cancer cells by modulating multiple signaling pathways.** *J Pineal Res* 2012, in press.
37. Cutando A, Aneiros-Fernández J, López-Valverde A, Arias-Santiago S, Aneiros-Cachaza J, Reiter RJ: **A new perspective in Oral health: potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity.** *Arch Oral Biol* 2011, **56**:944-950.
38. Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E: **Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells.** *Oral Oncol* 2004, **40**:728-735.

39. López de Cicco R, Bassi DE., Page R, Klein-Szanto AJ: **Furin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity and other sites evaluated by tissue microarray technology.** *Acta Odontol Latinoam* 2004, **15**:29-37.
40. Fan LL, Sun GP, Wei W, Wang ZG, Ge L, Fu WZ, Wang H: **Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**:1473-1481.
41. Margheri M, Pacini N, Tani A, Nosi D, Squecco R, Dama A, Masala E, Francini F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L: **Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: molecular basis for the anticancer effect of these molecules.** *Eur J Pharmacol* 2012, **681**:34-43.
42. Zhang S, Qi Y, Zhang H, He W, Zhou Q, Gui S, Wang Y: **Melatonin inhibits cell growth and migration, but promotes apoptosis in gastric cancer cell line.** *Biotech Histochem* 2012 **88**:281-289.
43. Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ: **Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**:1407-1426.
44. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong, JW, Kim YJ: **Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia.** *J Pineal Res* 2010, **48**:178-184.
45. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ: **Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients.** *Neuro Endocrinol Lett* 2001, **22**:45-47.
46. Vaupel P: **The role of hypoxia-induced factors in tumor progression.** *Oncologist* 2004, **9**:10-17.
47. Spencer C., Montalvo J., Sarah R., Mclaughlin, S. R., Bryan, B: **A. Small molecule inhibition of cytoskeletal dynamics in melanoma tumors results in altered transcriptional expression patterns of key genes involved in tumor initiation and progression.** *Cancer Genomics Proteomics* 2011, **8**:77-85.

48. Patel R.A., Forinash K.D., Pireddu R., Sun Y., Sun N., Martin M.P., Schönbrunn E., Lawrence N.J., Sebti S.M: **RKI-1447 is a potent inhibitor of the Rho-associated ROCK-1 kinases with anti-invasive and antitumor activities in breast cancer.** *Cancer Res* 2012, **1**:5025-5034.
49. Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP: **Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **269**:652-659.
50. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I: Rho/ROCK-1 pathway as a target of tumor therapy. *J Neurosci Res* 2006, **83**:243-255.
51. Liu X, Choy E, Hornicek FJ, Yang S, Yang C, Harmon D, Mankin H, Duan Z: **ROCK-1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma.** *J Orthop Res* 2011, **29**:1259-1266.
52. Yang X, Di J, Zhang Y, Zhang S, Lu J, Liu J, Shi W: **The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer.** *Biomed Pharmacother* 2012, **66**:221-227.
53. Saito K, Sakaguchi M, Lioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E: **Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells.** *Oncogene* 2013, in press.
54. Cengiz MI, Cengiz S, Wang HL: **Melatonin and oral cancer.** *Int J Den* 2012, **1**-9.
55. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Pimkhaokham A, Yamamoto G, Irie T, Tachikawa T, Amagasa T, Inazawa J, Imoto I: **Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma.** *Cancer Sci* 2008, **99**:1390-1400.
56. Jablonska K, Pula B, Zemla A, Owczarek T, Wojnar A, Rys J, Ambicka A, Podhorska-Okolow M, Ugorski M, Dziegiel P: Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *J Pineal Res* 2013, **54**:334-345.

## **5 - CONCLUSÕES**

---

## 5 - Conclusões

Com base nos resultados do presente estudo apresentamos as seguintes conclusões:

- ✓ O tratamento com melatonina diminui a viabilidade celular na linhagem SCC25.
- ✓ O tratamento com melatonina é capaz de inibir a expressão dos genes proangiogênicos *HIF-1 $\alpha$*  e *VEGF* em condições de hipóxia, assim como a expressão do gene prometastático *ROCK-1* na linhagem SCC9.
- ✓ A melatonina não é capaz de inibir a expressão dos genes estudados na linhagem SCC25.
- ✓ A melatonina confirmou efeito antiangiogênico e antimetastático na linhagem SCC9.



## **6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6- Referências Bibliográficas

AGOSTINI M.; SILVA S.D.; ZECCHIN K.G.; COLETTA R.D.; JORGE J.; LODA M.; GRANER E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. **Oral Oncol**, v.40, p.728–735, 2004.

AL-DISSI A.N.; HAINES D.M.; SINGH B.; KIDNEY B.A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. **Can Vet J**, v.51, p.1109–1114, 2010.

AL-GREENE N.T.; MEANS A.L.; LU P.; JIANG A.; SCHMIDT C.R., CHAKRAVARTHY A.B.; MERCHANT N.B.; WASHINGTON M.K.; ZHANG B; SHYR Y.; DEANE N.G.; BEAUCHAMP R.D. Four jointed box 1 promotes angiogenesis and is associated with poor patient survival in colorectal carcinoma. **PLoS One**, v.8, p. 66-69, 2013.

ALVAREZ-GARCÍA V.; GONZÁLEZ A.; ALONSO-GONZÁLEZ C.; MARTÍNEZ-CAMPA C.; COS S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. **J Pineal Res**, 2012, (Epub ahead of print).

AMBASTA R.K.; SHARMA A.; KUMAR P. Nanoparticle mediated targeting of VEGFR and cancer stem cells for cancer therapy. **Vasc Cell**, v. 3, p. 26, 2011.

ANIS R.; GABALLAH K.; Oral cancer in the UAE: a multicenter, retrospective study. **Libyan J Med**, v. 8, p. 217- 222, 2013.

AZZI S.; HEBDA J.K.; GAVARD J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. **Front Oncol**, v. 3, p. 211, 2013.

BERGERS G.; BENJAMIN L.B. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews – Cancer**, v.3, p. 401-410, 2003.

BRITO L.G.O.; SCHIAVON V.F.; DE ANDRADE J.M.; TIEZZI D.G.; PERIA F.M.; MARANA H.R.C. Expression of Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  and Vascular endothelial growth factor-C in locally advanced breast cancer patients. **Clinics**, v. 66, p.1313-1319, 2011.

CANKOVIC M.; ILIC M.P.; VUCKOVIC N.; BOKOR-BRATIC M. The histological characteristics of clinically normal mucosa adjacent to oral cancer. **J Cancer Res Ther**, v. 9, p. 240-244, 2013.

CAO Y.; LI C.Y.; MOELLER B.J.; YU D.; ZHAO Y.; DREHER M.R.; et al. Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. **Cancer Res**, v.65, p.5498-505, 2005.

CAPPELLARI O.; COSSU G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. **Circulation Research**, v. 113, p. 341-348, 2013.

CARBAJO-PESCADOR S.; ORDOÑEZ R.; BENET M.; JOVER R.; GARCÍA-PALOMO A.; MAURIZ J. L.; GONZÁLEZ-GALLEGO J. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. **Br J Cancer**, v.1, p.83-91, 2013.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249-257, 2000.

CENGIZ, M. I.; CENGIZ, S.; WANG, H-L. Melatonin and oral câncer. **Int J Den**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

CHAIYARIT P.; MA N.; HIRAKU Y. et al. Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. **Cancer Science**, vol. 96, p.553–559, 2005.

CHIN D.; BOYLE G. M.; PORCEDDU S.; THEILE D. R.; PARSONS P. G.; COMAN W. B. Head and neck cancer: past, present and future. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.6, p.1111–1118, 2006.

CLINKARD D.; AMOODI H.; KANDASAMY T.; GREWAL A.S.; CHEN S.; QIAN W. et al. Changes in the cochlear vasculature and vascular endothelial growth factor and its receptors in the aging c57 mouse cochlea. **Otolaryngol**, 2013 [Epub ahead of print]

CUTANDO A.; ANEIRO-S-FERNÁNDEZ J.; LÓPEZ-VALVERDE A.; ARIAS-SANTIAGO S.; ANEIRO-S-CACHAZA J.; REITER R.J. A new perspective in Oral health: potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity. **Arch Oral Biol**, v.56, p.944-950, 2011.

CUTANDO A.; LÓPEZ-VALVERDE A.; ARIAS-SANTIAGO S.; DE V. J.; DE D. R.G. Role of melatonin in cancer treatment. **Anticancer Res**, v.32, p.2747-253, 2012.

DACHS G.U.; KANO M.; VOLKOVA E.; MORRIN H.R.; DAVEY V.C.L.; HARRIS G.C. A profile of prognostic and molecular factors in European and Māori breast cancer patients. **BMC Cancer**, v. 10, p. 543, 2010.

DAI, M.; CUI, P.; YU, M. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1  $\alpha$  induced by  $\text{CoCl}_2$  in cultured cancer cells. **J Pineal Res**, v. 44, p. 121-126, 2008.

DANIELCZYK, K.; DZIEGIEL, P.M.T. Melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 63, p. 425-434, 2009.

DI BELLA G.; MASCIA F.; GUALANO L.; DI BELLA L. Melatonin anticancer effects: review. **Int J Mol Sci**, v.24; p.2410-2430, 2013.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. Melatonin in cardiovascular disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, vol. 21, p. 1593–1596, 2012.

DONG L.V.; PEI-LIN C.; SHI-WEI Y.; YOU-QING X.; ZHAO-XU Y. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. **Chin J Cancer Res**, v.24, p. 310-316, 2012.

DOS SANTOS M.; MERCANTE A.M.; LOURO I.D.; GONÇALVES A.J.; DE CARVALHO M.B.; DA SILVA E.H.; DA SILVA A.M. HIF1- $\alpha$  expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **PLoS One**, v.7, p.45-48, 2012.

ECKERT A. W.; KAPPLER M.; SCHUBERT J.; TAUBERT H. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Maxillofac Surg**, v.16, p.189-196. 2012.

FAN L. L.; SUN G. P.; WEI W.; WANG Z. G.; GE L.; FU W. Z.; WANG H. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. **World J Gastroenterol**, v.16, p. 1473-1481, 2010.

FERRARA N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, p. 21-26, 2010.

FINLEY S.D.; DHAR M.; POPEL A.S. Compartment model predicts VEGF secretion and investigates the effects of VEGF trap in tumor-bearing mice. **Front Oncol**, v. 3, p. 196, 2013.

FLAMANT L.; NOTTE A.; NINANE N.; RAES M.; MICHIELS C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. **Mol Cancer**, v. 13, p. 9- 191, 2010.

GARCÍA-NAVARRO, A.; GONZÁLEZ-PUGA, C.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C.; LÓPEZ, A.; LÓPEZ- CANTARERO, M.; CAMACHO, E.; ESPINOSA, A.; GALLO, M. A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. **J Pin Res**, v. 43, p. 195-205, 2007.

GARCÍA-SANTOS G.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F. et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. **J Pin Res**, vol. 41, p. 130–135, 2006.

GEORGE J.; NARANG R.S.; RAO N.N. Stromal response in different histological grades of oral squamous cell carcinoma: a histochemical study. **Indian J Dent Res**, v.23, p.842, 2012.

GERHARDT H.; BETSHOLTZ C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell Tissue Res**, v. 314, p.15-23, 2003.

GÓMEZ-MORENO G.; GUARDIA J.; FERRERA M. J.; CUTANDO A.; REITER R. J. Melatonin in diseases of the oral cavity. **Oral Dis**, v.16, p.242-247, 2010.

HARRIS A.L. Hypoxia — a key regulatory Factor in tumor growth. **Nature**, v. 2. p. 38-47, 2002.

HE M.; CHENG Y.; LI W.; LIU Q.; LIU J.; HUANG J.; FU X. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK1-2/moesin cascade. **BMC Cancer**, v.10, p.170, 2010.

HIGASHIMURA Y.; NAKAJIMA Y.; YAMAJI R.; HARADA N.; SHIBASAKI F.; NAKANO Y. et al. Up-regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression by HIF-1 activity depending on Sp1 in hypoxic breast cancer cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 509, p. 1-8, 2011.

HILMI C.; GUYOT M.; PAGÈS G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. **J Nucleic Acids**, v. 92, p. 16- 26, 2012.

HISSA, M. N.; LIMA, G. G.; SIMÕES, J. C.; NUNES, R. T. L. Melatonina e a glândula pineal. **Revista eletrônica Pesquisa médica**, v.2, p.1-10, 2008.

HUNG C.M.; CHANG C.C.; LIN C.W.; KO S.Y.; HSU Y.C. Cucurbitacin E as Inducer of Cell Death and Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line SAS. **Int J Mol Sci**, v.14, p. 17147-17156, 2013.

ISLAM M.; SHARMA S.; KUMAR B.; TEKNOS T. N. Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis. **Oral Oncol**, v.8, p.778-786, 2013.

JABLONSKA K.; PULA B.; ZEMLA A.; OWCZAREK T.; WOJNAR A.; RYS J.; AMBICKA A.; PODHORSKA-OKOLOW M.; UGORSKI M.; DZIEGIEL P. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. **J Pineal Res**, v. 54, p.334-345, 2013.

JUNG B.; AHMAD N. Melatonin in cancer management: progress and promise. **Cancer Res**, v. 66, p. 9789–93, 2006.

JUNG J.H.; SOHN E. J.; SHIN E. A.; LEE D.; KIM B.; JUNG D. B.; KIM J. H.; YUN M.; LEE H.J.; PARK Y. K.; KIM S. H. Melatonin Suppresses the Expression of 45S Preribosomal RNA and Upstream Binding Factor and Enhances the Antitumor Activity of Puromycin in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013. doi: 10.1155/2013/879746.

KACZOR, T. An Overview of Melatonin and Breast Cancer. **Natural Medicine Journal**, v. 2, n. 2, 2010.

KADEMANI D. Oral cancer. **Mayo Clin Proc**, v.82, p.878-887, 2007.

KALLERGI G.; MARKOMANOLAKI H.; GIANNOUKARAKI V.; PAPADAKI M.A.; STRATI A.; LIANIDOU E.S. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. **Breast Cancer Res**, v. 11, p. 84, 2009.

KAMAI T.; TSUJII T.; ARAI K.; TAKAGI K.; ASAMI H.; ITO Y.; OSHIMA H. Significant association of Rho/ROCK-1 pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. **Clin Cancer Res**, v.9, p.2632-2641, 2003.



KANEKO K.; SATOH K.; MASAMUNE A.; SATOH A.; SHIMOSEGAWA T. Expression of ROCK-1-1 in human pancreatic cancer: its down-regulation by morpholino oligo antisense can reduce the migration of pancreatic cancer cells in vitro. **Pancreas**, v. 24, p.251-257, 2002.

KANG F.W.; QUE L.; WU M.; WANG Z. L.; SUN J. Effects of trichostatin A on HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma cells in vitro. **Oncol Rep**, V.28, p.193-199, 2012.

KAPOOR P.; DESHMUKH R. VEGF: A critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: An IHC study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.16, p.330-337, 2012.

KIM J-Y.; AHN H-J.; RYU J-H.; SUK K.; PARK J-H. BH3-only Protein Noxa Is a Mediator of Hypoxic Cell Death Induced by Hypoxia-inducible Factor 1. **J. Exp. Med**, v. 199, p. 113–123, 2004.

KOSLA J.; PAŇKOVÁ D.; PLACHÝ J.; TOLDE O.; BICANOVÁ K.; DVOŘÁK M.; RÖSEL D.; BRÁBEK J. Metastasis of aggressive amoeboid sarcoma cells is dependent on Rho/ROCK/MLC signaling. **Cell Commun Signal**, v. 11, p. 51, 2013.

KORF, H. W.; SCHOMERUS, C. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 146, p. 1-100, 1998.

LAMBERT R.; SAUVAGET C. C. C. M.; SANKARANARAYANAN R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.23, n.8, p.633-641, 2011.

LANE J.; MARTIN T. A.; WATKINS G.; MANSEL R. E.; JIANG W. G. The expression and prognostic value of ROCK-1 I and ROCK-1 II and their role in human breast cancer. **Int J Oncol**, v.33, p.585-593, 2008.

LEE T.H.; SENG S, SEKINE M, HINTON C, FU Y, AVRAHAM HK, AVRAHAM S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. **PLoS Med**, v. 4, e. 186, 2007.

LISSENI P.; ROVELLI F.; MALUGANI F.; BUCOVEC R.; CONTI A.; MAESTRONI G.J. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. **Neuro Endocrinol Lett**, v.22. p.45-7, 2001.

LIU S.Y.; CHANG L.C.; PAN L.F.; HUNG Y.J.; LEE C.H.; SHIEH Y.S. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.44, p.277-285, 2008.

LIU S.; GOLDSTEIN R. H.; SCEPANSKY E. M.; ROSENBLATT M. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. **Cancer Res**, v.69, p. 8742–8751, 2009.

LIU X.; CHOY E.; HORNICEK F.J.; YANG S.; YANG C.; HARMON D.; MANKIN H.; DUAN Z. ROCK-11 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. **J Orthop Res**, v.29, p.1259-1266, 2011.

LIU A.Y.; OUYANG G. Tumor Angiogenesis: A New Source of Pericytes. **Current Biology**, v. 23, p. 565-568, 2013.

LI Z.; WANG D.; NA X.; SCHOEN SR.; MESSING E.M.; WU G. The VHL protein recruits a novel KRAB-A domain protein to repress HIF-1a transcriptional activity. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 1857-1867, 2003.

LÓPEZ DE CICCIO R.; BASSI D.E.; PAGE R.; KLEIN-SZANTO A.J. Furin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity and other sites evaluated by tissue microarray technology. **Acta Odontol Latinoam**, v.15, p.29-37, 2004.

LUCHETTI F.; CANONICO B.; BETTI M.; ARCANGELETTI M.; PILOLLI F.; PIRODDI M.; CANESI L.; PAPA S.; GALLI F. Melatonin signaling and cell protection function. **Faseb J**, v.24, p. 3603-3624, 2010.

LV D.; CUI P. L.; YAO S. W.; XU Y. Q.; YANG Z. X. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. **Chin J Cancer Res**, v. 24, n. 4, p.310-316, 2012.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JR, J. M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267-71, 2008.

MARGHERI M.; PACINI N.; TANI A.; NOSI D.; SQUECCO R.; DAMA A.; MASALA E.; FRANCINI F.; ZECCHI-ORLANDINI S.; FORMIGLI L. Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: molecular basis for the anticancer effect of these molecules. **Eur J Pharmacol**, v. 681, p.34-43, 2012.

MARTÍN, V.; HERRERA, F.; CARRERA-GONZALEZ, P. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. **Cancer Res**, v. 66, p. 1081–8, 2006.

MILANI M.; HARRIS AL. Targeting tumour hypoxia in breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 44, p. 2766-73, 2008.

MILLANTA F.; SILVESTRI G.; VASELLI C.; CITI S.; PISANI G.; LORENZI D.; POLI A. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 350–357, 2006.

MILLER S. C.; PANDI, P. S. R.; ESQUIFINO, A. I.; CARDINALI, D. P.; MAESTRONI G. J. M. The role of melatonin in immunoenhancement: potential application in cancer. **International Journal of Experimental Pathology**, vol. 87, p. 81–87, 2006.

MILKIEWICZ M.; HUDLICKA O.; SHINER R.; EGGINTON S.; BROWN M.D. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat. **J Physiol**, v. 577, p. 671-8, 2006.

MIMEAULT M.; BATRA S.K. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer and metastasis initiating cells. **J Cell Mol Med**, v. 17, p. 30-54, 2013.

MUHLBAUER, E.; ALBRECHT, E.; BAZWINSKY-WUTSCHKE, I.; PESCHKE, E. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT1 receptors in rat

insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. **Journal of Pineal Research**, v. 52, p. 446-459, 2012.

NAKAMURA E.; KOZAKI K.; TSUDA H.; SUZUKI E.; PIMKHAOKHAM A.; YAMAMOTO G.; IRIE T.; TACHIKAWA T.; AMAGASA T.; INAZAWA J.; IMOTO I. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. **Cancer Sci**, v.99, p.1390-1400, 2008.

NARUSE T.; KAWASAKI G.; YANAMOTO S.; MIZUNO A.; UMEDA M. Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 $\alpha$  pathway. **Anticancer Res**, v.12, p. 4429-37, 2011.

NETO, J. A. S.; SCALDAFERRI, P. M. Melatonina e câncer – revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 2005.

OLSSON AK.; DIMBERG A.; KREUGER J.; CLAEISSON-WELSH L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.7, p. 359-371, 2006.

OPREA-ILIES, G.; HAUS, E.; SACKETT-LUNDEEN, L.; LIU, Y.; MCLENDON, L.; BUSCH, R.; ADAMS, A.; COHEN, C. Expression of melatonin receptors in triple negative breast cancer (TNBC) in African American and Caucasian women: relation to survival. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 3, n. 137, p. 677-87, 2013.

ORTÍZ-LÓPEZ L.; MORALES-MULIA S.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ G.; BENÍTEZ-KING G. ROCK-1-regulated cytoskeletal dynamics participate in the

inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. **J Pineal Res**, v.46, p.15-21, 2009.

PANDE D.; NEGI R.; KHANNA S.; KHANNA R.; KHANNA H.D. Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Relation to Oxidative Damage and Antioxidant Status in Patients with Breast Cancer. **J Breast Cancer**, v. 14, p. 181-184, 2011.

PANDI-PERUMAL S. R.; BAHAMMAM A. S.; BROWN G. M. et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. **Neurotoxicity Research**, vol. 23, p. 267–300, 2013.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PARADIES, V.; REITER, R. J.; RUGGIERO, F. M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **J Pineal Res**, v. 48, p. 297-310, 2010.

PARK J. W.; HWANG M. S.; SUH S. I.; BAEK W. K. Melatonin down-regulates HIF-1  $\alpha$  expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. **J Pineal Res**, v. 46, p. 415-21, 2009.

PARK, S.Y.; JANG, W.J.; YI E.Y.; JANG, J.Y.; JUNG, Y.; JEONG, J.W.; KIM, Y.J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia. **J Pineal Res**, v.48, p.178-184, 2010.

PATEL R.A.; FORINASH K.D.; PIREDDU R.; SUN Y.; SUN N.; MARTIN M.P.; SCHÖNBRUNN E.; LAWRENCE N.J.; SEBTI S.M. RKI-1447 is a potent inhibitor of the Rho-associated ROCK-1 kinases with anti-invasive and antitumor activities in breast cancer. **Cancer Res**, v. 1, p.5025-34, 2012.

PATEL R. A.; LIU Y.; WANG B.; LI R.; SEBTI S. M. Identification of novel ROCK-1 inhibitors with anti-migratory and anti-invasive activities. **Oncogene**, 2013. (Epub ahead of print).

PÉREZ-SAYÁNS M.; SUÁREZ-PEÑARANDA J. M.; PILAR G. D.; BARROS-ANGUEIRA F.; GÁNDARA-REY J.M.; GARCÍA-GARCÍA A. Hypoxia-inducible factors in OSCC. **Cancer Lett**, v.26, p.1-8, 2011.

PIREDDU R.; FORINASH K.D.;SUN N.N.; MARTIN M.P.; SUNG S.S.; ALEXANDER B.; ZHU J.Y.; GUIDA W.C.; SCHÖNBRUNN E.; SEBTI S.M.; LAWRENCE N.J. Pyridylthiazole-based ureas as inhibitors of Rho associated protein kinases (ROCK1 and 2). **Medchemcomm**, v. 3, p. 699-709, 2012.

POZZI V.; SARTINI D.; MORGANTI S.; GIULIANTE R.; DI RUSCIO G.; SANTARELLI A.; ROCCHETTI R.; RUBINI C.; TOMASETTI M.; GIANNATEMPO G.; ORLANDO F.; PROVINCIALI M.; LO MUZIO L.; EMANUELLI M. RNA-Mediated Gene Silencing of Nicotinamide N-Methyltransferase Is Associated with Decreased Tumorigenicity in Human Oral Carcinoma Cells. **PLoS One**, v. 8, p. 71-72, 2013.

PRADEEP C.R.; SUNILA E.S.; KUTTAN G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. **Integr Cancer Ther**, v. 4, p. 315-21, 2005.

PRUNET-MARCASSUS, B.; DESBAZEILLE, M.; BROS, A. et al. Melatonin reduces body weight gain in sprague dawley rats with dietinduced obesity. **Endocrinology**, vol. 144, p. 5347–5352, 2003.

RAHIMI N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. **Mol Cancer Ther**, v. 11, p. 538-48, 2012.

RAMÍREZ-RODRÍGUEZ G.; ORTIZ-LÓPEZ L.; BENÍTEZ-KING G. Melatonin increases stress fibers and focal adhesions in MDCK cells: participation of Rho-associated kinase and protein kinase C. **J Pineal Res**, v.42, p.180-190, 2007.

RATTAN R.; GIRI S.; SINGH A.K.; SINGH I. Rho/ROCK-1 pathway as a target of tumor therapy. **J Neurosci Res**, v.83, p.243-255, 2006.

RAVINDRA, T.; LAKSHMI, N. K.; AHUJA, Y. R. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. **Indian J Med Sci**, v. 60, n. 12, p. 523-35, 2006.

RAVIRAJ V.; FOK S.; ZHAO J.; CHIEN H.Y.; LYONS J.G.; THOMPSON E.W.; SOON L. Regulation of ROCK-11 via Notch1 during breast cancer cell migration into dense matrices. **BMC Cell Biol**, v.13, 2012.

REINMUTH N.; LIU W.; JUNG Y.D.; AHMAD S.A.; SHAHEEN R.M.; FAN F. et al. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. **FASEB J**, v. 15, p. 1239-41, 2001.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; KORKMAZ, A. et al. Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. **Critical Reviews in Oncogenesis**, vol. 13, p. 303– 328, 2007.

RHEINWALD J. G.; BECKETT M. A. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. **Cancer Res**, v.41, p. 1657-1663, 1981.



RODRIGUEZ C.; MARTÍN V.; HERRERA F.; GARCÍA-SANTOS G.; RODRIGUEZ-BLANCO J.; CASADO-ZAPICO S.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ A.M.; SUÁREZ S.; PUENTE-MONCADA N.; ANÍTUA M.J.; ANTOLÍN I. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 6597-6613, 2013.

RUAN K.; SONG G.; OUYANG G. Role of Hypoxia in the Hallmarks of Human Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, p. 1053–1062, 2009.

RUIZ DE ALMODOVAR C.; LAMBRECHTS D.; MAZZONE M.; CARMELIET P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. **Physiol Rev**, v. 89, p. 607-48, 2009.

RUIZ-RABELO J.; VÁZQUEZ R.; ARJONA A.; PEREA D.; MONTILLA P.; TÚNEZ I.; MUNTANÉ J.; PADILLO J. Improvement of capecitabine antitumoral activity by melatonin in pancreatic cancer. **Pancreas**, v.40, p.410-414, 2011.

SAINZ R.M.; MAYO J.C.; RODRIGUEZ C.; TAN D.X.; LOPEZ-BURILLO S.; REITER R.J. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cell Mol Life Sci**, v.60, p. 1407-1426, 2003.

SAITO K.; SAKAGUCHI M.; LIOKA H.; MATSUI M.; NAKANISHI H.; HUH N. H.; KONDO E. Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. **Oncogene**, 2013

SANCHEZ-BARCELO, E. J.; MEDIAVILLA, M. D.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. **Journal of Osteoporosis**, vol. 2010, p.60-70, 2010.

SCHERNHAMMER E.S.; HANKINSON S.E. Urinary melatonin levels and postmenopausal breast cancer risk in the Nurses' Health Study cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, p. 74-79, 2009.

SEMENZA GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p.62-67, 2002.

SENGER D.R.; GALLI S.J.; DVORAK A.M.; PERRUZZI C.A.; HARVEY V.S.; DVORAK H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, p. 983-985, 1983.

SHI J.; WEI L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.55, p.61-75, 2007.

SHIN J.M.; JEONG Y.J.; CHO H.J.; PARK K.K.; CHUNG I.K.; LEE I.K. et al. Melittin Suppresses HIF-1 $\alpha$ /VEGF Expression through Inhibition of ERK and mTOR/p70S6K Pathway in Human Cervical Carcinoma Cells. **PLoS One**, v. 8, p.68-70, 2013.

SLAUGHTER D.P.; SOUTHWICK H.W.; SMEJKAL W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implication of multicentric origin. **Cancer (Phila)**, v.6, p.963-968, 1953.

SOMLYO A.V.; BRADSHAW D.; RAMOS S.; MURPHY C.; MYERS C.E.; SOMLYO A.P. Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 269, p.652-659, 2000.

SPENCER C.; MONTALVO J.; SARAH R.; MCLAUGHLIN, S. R.;BRYAN, B. A. Small molecule inhibition of cytoskeletal dynamics in melanoma tumors results

in altered transcriptional expression patterns of key genes involved in tumor initiation and progression. **Cancer Genomics Proteomics**, v.8, p.77-85, 2011.

STEFANINI M.O.; WU F.T.; MAC GABHANN F.; POPEL A.S. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. **BMC Syst Biol**, v. 2, p. 77, 2008.

STEEG P.S.; THEODORESCU D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5, p. 206-219, 2008.

STÎNGĂ A.C.; MĂRGĂRITESCU O.; STÎNGĂ A.S.; PIRICI D.; CIUREA R.; BUNGET A.; CRUCE M. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: a morphometric study. **Rom J Morphol Embryol**, v. 52, p. 1269-1275, 2011.

SULLIVAN R.; GRAHAM C.H. Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. **Mol Cancer Ther**, v. 8, p.1702-13, 2009.

SYED KHAJA A.S.; DIZEYI N.; KOPPARAPU P.K.; ANAGNOSTAKI L.; HÄRKÖNEN P.; PERSSON J.L. Cyclin A1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and promotes hormone-dependent growth and angiogenesis of breast cancer. **PLoS One**, v. 8, p.722-725, 2013.

TAMURA, E. K. **Efeito da melatonina sobre a produção endotelial de óxido nítrico in vitro e in vivo**. 2009, 150f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Ciências – Área de Fisiologia Geral, São Paulo, São Paulo, 2009.

TANEJA P.; MAGLIC D.; KAI F.; ZHU S.; KENDIG R.D.; FRY E.A.; INOUE K. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 4, p. 15–34, 2010.

TANG L.; MA X.; TIAN Q.; CHENG Y.; YAO H.; LIU Z. et al. Inhibition of angiogenesis and invasion by DMBT is mediated by downregulation of VEGF and MMP-9 through Akt pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 204–213, 2013.

TUNG K.H.; LIN C.W.; KUO C.C.; LI L.T.; KUO Y.H.; LIN C.W. et al. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF signaling. **Cancer Lett**, v. 331, p. 58-67, 2013.

VAUPEL P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. **Oncologist**, v.9, p.10-17, 2004.

VIJAYALAXMI THOMAS C.R Jr.; REITER R.J.; HERMAN T.S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **J Clin Oncol**, v. 20, p. 2575–2601, 2002.

VIGIL D.; KIM T.Y.; PLACHCO A.; GARTON A.J.; CASTALDO L.; PACHTER J.A.; DONG H.; CHEN X.; TOKAR B.; CAMPBELL S.L.; DER C.J. ROCK-11 and ROCK-12 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion. **Cancer Res**, v.72, p.5338-5347, 2012.

VORDERMARK D. Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. **BMC Med**, v. 8, p. 45, 2010

WANG T.; KENDIG D.M.; SMOLOCK E.M.; MORELAND R.S. Carbachol-induced rabbit bladder smooth muscle contraction: roles of protein kinase C and Rho kinase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.297, p.1534-42, 2009.

WANG J.; GUO W.; CHEN W.; YU W.; TIAN Y.; FU L.; SHI D.; TONG B.; XIAO X.; HUANG W.; DENG W. Melatonin potentiates the antiproliferative and pro-apoptotic effects of ursolic acid in colon cancer cells by modulating multiple signaling pathways. **J Pineal Res**, 2012.

WANG, J.; XIAO, X.; ZHANG, Y.; SHI, D.; CHEN, W.; FU, L.; LIU, L.; XIE, F.; KANG, T.; HUANG, W.; DENG, W. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. **J Pineal Res**, v. 53, p. 77-90, 2012.

WALTENBERGER J.; CLAEISSON-WELSH L.; SIEGBAHN A.; SHIBUYA M.; HELDIN C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, v. 269, p.288-95, 1994.

WEI H.; LI F.;FU P.; LIU X. Effects of the silencing of hypoxia-inducible Factor-1 alpha on metastasis of pancreatic cancer. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, p. 436-446, 2013.

WEIS S.M.; CHERESH D.A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med**, v. 17, p. 1359-70, 2011.

ZHANG J.; LU A.; LI L.; YUE J.; LU Y. p16 Modulates VEGF expression via its interaction with HIF-1alpha in breast cancer cells. **Cancer Invest**, v. 28, p. 588-97, 2010.

ZHANG S.; QI Y.; ZHANG H.; HE W.; ZHOU Q.; GUI S.; WANG Y. Melatonin inhibits cell growth and migration, but promotes apoptosis in gastric cancer cell line. **Biotech Histochem**, v.88, n. 6, p. 281-9, 2012.

ZHANG Y.; LIU Q.; WANG F.; LING E. A.; LIU S.; WANG L.; YANG Y.; YAO L.; CHEN X.; WANG F.; SHI W.; GAO M.; HAO A. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 $\alpha$ . **J Pineal Res**, v. 55, p. 121-130, 2013.

ZHAO D.; XU Q.G.; CHEN X.M.; FAN M.W. Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer. **Int J Oral Sci**, v.3, p.119-125, 2009.

ZHAO S. F.; YANG X. D.; LU M. X.; SUN G. W.; WANG Y. X.; ZHANG Y. K.; PU Y. M.; TANG E. Y. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. **Tumour Biol**, 2013 (Epub ahead of print).

ZHOU M.J.; ZHENG L.; GUO L.; LIU W.L.; LV C.; JIANG L.H.; OU C.S.; DING Z.H. Differential responses to UVB irradiation in human keratinocytes and epidermoid carcinoma cells. **Biomed Environ Sci**, v. 25, p.583-589, 2012.

YANG X.; DI J.; ZHANG Y.; ZHANG S.; LU J.; LIU J.; SHI W. The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer. **Biomed Pharmacother**, v.66, p.221-227, 2012.